

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie (P1519)

YMBG (1501V000)



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Klára Lhotová

**Analýza hereditárních genetických variant
predisponujících ke vzniku familiární formy karcinomu
ovarí**

Analysis of hereditary genetic variants predisposing to the
development of familial forms of ovarian cancer

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Jana Soukupová Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.09.2020

Klára Lhotová

Identifikační záznam:

LHOTOVÁ, Klára. *Analýza hereditárních genetických variant predisponujících ke vzniku familiární formy karcinomu ovaria. [Analysis of hereditary genetic variants predisposing to the development of familial forms of ovarian cancer]*. Praha, 2020. 91 s. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK 2020. Školitelka: Soukupová, Jana.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce RNDr. Janě Soukupové Ph.D. za nekonečnou trpělivost a veškerý čas, který věnovala této práci nad rámec svých povinností, celé laboratoři onkogenetiky za všechno, co mě naučili, a svému muži za léta podpory.

ABSTRAKT

Karcinom ovaria (OC) je závažné nádorové onemocnění s velkým podílem hereditárních forem a častou asociací s karcinomem prsu. Genetické testování umožňuje vytvoření preventivních programů pro nosičky mutací v genech predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria a případně dalších malignit. Prevalence dědičných mutací se v jednotlivých predispozičních genech mezi populacemi často liší.

V této studii jsme analyzovali 1333 pacientek s karcinomem ovaria a 2278 populačně-specifických kontrol (PSK) pomocí sekvenování nové generace s využitím panelu CZEKANCA cílícího na 219 genů. Dohromady byla nalezena patogenní mutace v některém z 18 genů predisponujících k dědičnému karcinomu prsu a/nebo ovaria u 427/1333 (32,0%) OC pacientek a 58/2278 (2,5%) PSK. S vysokým rizikem vzniku karcinomu ovaria ($OR > 5$) byly asociovány mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* a v genech účastnících se opravy DNA mechanismem nesprávně spárovaných bazí (MMR). Mutace v genech *BRIP1* a *NBN* byly asociovány se středním rizikem vzniku karcinomu ovaria ($OR \geq 2$ – < 5). Mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* byly nejčastější téměř ve všech klinicko-patologických podskupinách, včetně borderline nádorů s nejasným maligním potenciálem (BTO). V rámci dalších 201 analyzovaných genů byly alespoň se středním rizikem vzniku karcinomu ovaria asociovány mutace v genech *PPM1D* (ve formě mozaiky), *SHPRH* a *NAT1*. K upřesnění významu mutací v těchto genech jsou však s ohledem na jejich nízkou četnost potřeba další studie na větších souborech a v dalších populacích.

Tato studie poukazuje na vysoký podíl pacientek s dědičnou formou OC ve slovanské populaci, který odůvodňuje genetické testování u všech pacientek s OC, včetně BTO.

Klíčová slova: nádorová predispozice, mutace, sekvenování nové generace, karcinom ovaria, predispoziční geny

SUMMARY

Ovarian cancer (OC) is the deadliest gynecologic malignancy with a substantial proportion of hereditary cases and a frequent association with breast cancer (BC). Genetic testing facilitates preventive management for carriers of mutations in OC-susceptibility genes. However, the prevalence of germline mutations varies among populations and many rarely mutated OC predisposition genes remain to be identified.

We analyzed 219 genes in 1333 Czech OC patients and 2278 population-matched controls (PMC) using next-generation sequencing. Altogether, 427/1333 (32%) patients and 58 /2278 (2,5%) PMC carried pathogenic mutations in 18 known/anticipated OC predisposition genes. Mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* and mismatch repair genes conferred a high OC risk (with $OR > 5$). Mutations in *BRIP1* and *NBN* were associated with moderate risk (both $OR \geq 2$ - < 5). *BRCA1/2* mutations dominated in almost all clinicopathological subgroups including sporadic borderline tumors of ovary (BTO). Analysis of remaining 201 genes revealed somatic mosaics in *PPMID* and germline mutations in *SHPRH* and *NAT1* associating with a high/moderate OC risk significantly; however, further studies are warranted to delineate their contribution to OC development in other populations.

Results of this study demonstrate the high proportion of patients with hereditary OC in Slavic population justifying genetic testing in all patients with OC, including BTO.

Key words: genetic predisposition, mutation, next-generation sequencing, ovarian cancer, predisposition genes

OBSAH

ÚVOD	3
Biologie nádoru	3
Oprava poškození DNA	5
Přímá oprava DNA	6
Excizní reparace	6
Oprava nesprávně spárovaných bází (MMR)	7
Oprava dvouřetězcových zlomů	8
Karcinom ovaria	11
Histopatologická klasifikace	12
Stádium onemocnění	13
Dědičná predispozice ke karcinomu ovaria	17
Geny asociované s vysokým/významně zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria	22
Geny asociované s možným zvýšením rizika vzniku karcinomu ovaria	25
Geny asociované se syndromem dědičného karcinomu prsu/ovarí, avšak s nestanoveným/nezvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria	27
Další geny	29
CÍL PRÁCE	30
METODY	31
Soubor testovaných osob	31
Sekvenování nové generace - NGS	32
Příprava sekvenačního panelu	32
Příprava sekvenační knihovny	33
Sekvenování knihovny	39
Bioinformatická analýza	40
Klasifikace variant	42
Sangerovo sekvenování	42
MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)	43
Statistická analýza	44
VÝSLEDKY	45
Charakterizace pacientek s karcinomem ovaria	45
Mutace v 18 genech predisponujících k syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria	46
Klinická a histopatologická charakteristika pozitivně testovaných pacientek	50
Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k věku v době diagnózy	51

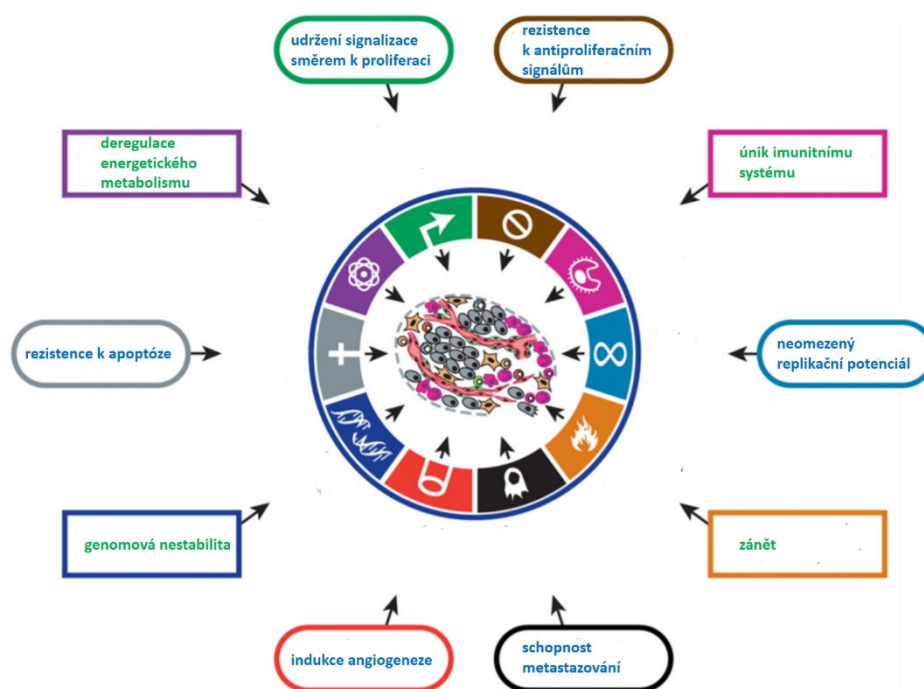
Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k osobní a rodinné nádorové anamnéze	52
Charakteristika nosičů mutace vzhledem ke stádiu a histologii onemocnění	53
Mutace v dalších 201 analyzovaných genech	54
DISKUZE	61
ZÁVĚR	69
SEZNAM ZKRATEK.....	70
CITACE	72
PŘÍLOHY	88

ÚVOD

Karcinom ovaria je pátým nejčastějším nádorovým onemocněním žen celosvětově (Goodman, Howe et al. 2003, Ferlay, Parkin et al. 2010), přičemž incidence a mortalita se v čase výrazně nemění. V České republice bylo v roce 2017 diagnostikováno 982 nových případů, z nichž 641 skončilo úmrtím (www.svod.cz). Přibližně u dvou třetin pacientek je onemocnění diagnostikováno v pokročilém stádiu, což do určité míry vysvětluje jeho vysokou mortalitu, nejvyšší v rámci gynekologických malignit (Ferlay, Parkin et al. 2010). Pozdní diagnóza, která je spojená se špatnou prognózou, je způsobena především asymptomatickým začátkem onemocnění a omezenými diagnostickými možnostmi. Je proto důležité identifikovat ženy s vysokým či významně zvýšeným rizikem vzniku tohoto onemocnění.

Biologie nádoru

Nádorové onemocnění je genetické onemocnění charakteristické nekontrolovatelným buněčným dělením. Tumorigeneze je považována za několikafázový proces, při kterém jsou normální buňky transformovány na maligní za vzniku maligního nádoru. Aby mohlo dojít k maligní transformaci, je zapotřebí specifických vlastností jak buňky, tak samotného nádorového mikroprostředí. Tyto vlastnosti jsou definovány jako „The hallmarks of cancer“ (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011). V roce 2000 bylo popsáno prvních 6 vlastností charakteristických pro vznik a růst nádoru: 1) udržení signalizace směrem k proliferaci, 2) rezistence k antiproliferačním signálům, 3) rezistence k apoptóze, 4) indukce angiogeneze 5) neomezený replikační potenciál a 6) schopnost metastazování (Hanahan and Weinberg 2000). Od té doby byly charakterizovány další vlastnosti nádorů (Obrázek 1) (Hanahan and Weinberg 2011).



převzato a upraveno z Hanahan and Weinberg, 2011 (Hanahan and Weinberg 2011)

Obrázek 1 - schématické znázornění charakteristických vlastností nádorové. Tyto vlastnosti jsou definovány jako „The hallmarks of cancer“.

Za normálních okolností je proliferace buňky přísně kontrolována. Pokud buňka získá klíčové vlastnosti jako soběstačnost v produkci růstových signálů, rezistenci k signálům potlačující růst, schopnost se vyhnout programované buněčné smrti a schopnost neomezené replikace, její další dělení je označováno za nádorovou proliferaci (Hanahan and Weinberg 2000). Buňka, která má schopnost indukovat angiogenezi pak dokáže zajistit přísun živin a kyslíku do rostoucího nádoru. Schopnost invaze do okolní tkáně umožňuje rozšíření nádoru do vzdálenějších míst. Deregulace energetického metabolismu podporuje růst buněk a jejich proliferaci, jež je podpořena i jejich schopností uniknout imunitnímu systému (Hanahan and Weinberg 2011). Dalšími charakteristickými vlastnostmi tumorogeneze jsou genomová nestabilita, která vede k akumulaci genetických alterací v nádorových buňkách, a zánět, který přivádí k nádoru růst-podporující či jiné biomolekuly. Genomová nestabilita, která vede ke zvýšení frekvence vzniku mutací, je často zapříčiněna mutacemi v genech podílejících se na udržování genomové integrity a opravách poškozené DNA. Získáním výše uvedených vlastností, jež charakterizují nádorovou buňku a její mikroprostředí, se buňka stává maligní (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011).

Nádorové mikroprostředí vykazuje velkou heterogenitu. Je tvořeno nádorovými buňkami s infiltrovanými zdravými buňkami různých tkání (Kreso and Dick 2014), vyvíjí se společně s nádorem a v tumorigenezi hraje důležitou roli. Progrese nádoru je dána hromaděním somatických mutací, které nesou selektivní výhodu pro buňky, ve kterých vznikají. Tyto mutace vznikají relativně náhodně, zejména při replikaci a v důsledku poškození DNA. Pokud není poškozená DNA opravena, vzniklé mutace se v genomu buňky fixují a přenášejí do dalších generací (Stratton, Campbell et al. 2009). Buňky, jež nesou mutace, které jsou pro její přežití nevýhodné, jsou eliminovány přirozenou selekcí. Ovšem buňky, které nesou mutace, které jsou pro-proliferativní, jsou přirozeně zvýhodňovány a lépe přežívají (Nowell 1976). Dle vlivu na selekci a fitness buňky můžeme mutace v nádorovém genomu rozdělit na „drivers“ mutace a „passengers“ mutace (Stratton, Campbell et al. 2009). „Drivers“ neboli řídicí mutace jsou takové, které poskytují buňce selekční výhodu, naopak „passengers“, neboli doprovodné mutace buňce selekční výhodu nepřinášejí a pro tumorigenezi nejsou klíčové (Vogelstein and Kinzler 2015).

Oprava poškození DNA

Molekula DNA, stejně tak jako jakákoliv jiná molekula může být součástí různých chemických reakcí. Jelikož DNA funguje jako unikátní kopie buněčného genomu, jakákoliv změna ve struktuře by mohla mít fatální následky. Přesto jsou změny ve struktuře DNA poměrně častým jevem. Poškození vznikají zejména v důsledku replikačních chyb, působením kyslíkových radikálů, či vlivem prostředí např. UV zářením (Hoeijmakers 2001). Nejčastějšími typy poškození DNA v buňkách jsou jednořetězcové zlomy DNA (single-strand breaks; SSBs) nejméně časté, avšak nejzávažnějšími, jsou dvouřetězcové zlomy DNA (double-strand breaks; DSBs) (Tubbs and Nussenzweig 2017). Molekula DNA je, na rozdíl od jiných biomolekul, opravována. Dráha oprav poškození DNA (DNA damage network; DDR dráha) chrání buňku před dopady poškození DNA (Jackson and Bartek 2009), s cílem rozpoznat poškození DNA a zahájit jejich opravu ještě před buněčnou proliferací. Deficit v DDR vede k akumulaci poškození DNA (tedy ke genomové nestabilitě) (Kennedy and D'Andrea 2006), která mohou ve svém důsledku vést k inaktivaci tumor supresorových genů, nebo aktivaci onkogenů. Poškození DDR v nádorových buňkách může ovlivňovat léčebnou odpověď.

Mechanismy oprav poškození DNA zajišťující integritu genomu mohou být rozděleny do šesti vzájemně propojených cest: přímé opravy DNA; dále opravy mechanismem excizní reparace zahrnující báзовou excizní reparaci (base excision repair; BER) a nukleotidovou excizní

reparaci (nucleotide excision repair; NER); opravu nesprávně spárovaných bazí (mismatch repair; MMR), a opravy dvouřetězcových zlomů pomocí nehomologního spojování konců (non-homologous end joining; NHEJ) a homologní rekombinací (homologous recombination; HR). Jednotlivé dráhy jsou využívány v závislosti na typu poškození či na fázi buněčného cyklu.

Přímá oprava DNA

Přímá chemická oprava DNA zajišťuje reverzi poškození DNA přímo, bez štěpení cukr-fosfátové kostry DNA (Yi and He 2013). U člověka se v přímé reparaci uplatňují O⁶-methylguanin-DNA methyltransferáza (MGMT) a dioxygenázy rodiny AlkB. O⁶-methylguanin-DNA methyltransferáza odstraňuje alkylovou skupinu na O⁶ pozici guaninu. O⁶-methylguanin se místo cytosinu páruje s tyminem (Esteller, Hamilton et al. 1999). Rodina dioxygenáz AlkB odstraňuje alkylové adukty z bazí oxidativní deaminací. Tyto enzymy vyžadují pro svou aktivitu Fe²⁺ a α -ketoglutarát (Fedeles, Singh et al. 2015).

Excizní reparace

Společným rysem oprav poškození DNA pomocí excizních reparací je odstranění poškozené báze a následně nahrazení poškozeného místa/úseku.

BÁZOVÁ EXCIZNÍ REPARACE (BER)

BER je hlavním opravným mechanismem poškození zasahujících jednotlivé báze, které jsou modifikovány buněčným metabolismem včetně kyslíkových radikálů (Hoeijmakers 2001). BER funguje na základě odstranění jednoho (krátká cesta) nebo několika nukleotidů (2-15nt; dlouhá cesta). Krátká reparační cesta začíná odstraněním poškozené báze glykosidázou a endonukleázou APE1. Vzniklý jednořetězcový zlom je rozpoznán PARP1 s následnou tvorbou polymeru poly(ADP-ribózy), který umožňuje vazbu XRCC1 a následně DNA polymerázy β spolu s DNA ligázou III, které apurinové místo dosyntetizují a opravu ukončí spojením řetězců DNA. V případě dlouhé cesty BER se do místa zlomu vzniklého po odstranění modifikované báze váží XRCC1 a PNK kináza (polynukleotid kinase), která upravuje konce vláken DNA (5' fosfátové- a 3' hydroxy- skupiny). PCNA protein (Proliferating cell nuclear antigen) a polymeráza δ/ϵ uvolní a následně vyplní mezeru 2 -15 nukleotidy, kdy vznikne přesah, který je následně rozpoznán a odštěpen endonukleázou FEN1 (flap endonuclease). Posledním krokem je spojení řetězce pomocí DNA ligázy (Baute and Depicker 2008). Deficit PARP-1 proteinu

vede k inhibici tvorby XRCC1 ohniska (El-Khamisy, Masutani et al. 2003). V případě celkově nefunkční BER dráhy, dochází k tvorbě dvouřetězcových zlomů DNA jako následek kolize SSB proteinů s postupující replikační vidličkou (Gottipati, Vischioni et al. 2010).

NUKLEOTIDOVÁ EXCIZNÍ REPARACE (NER)

NER je opravný mechanismus řady poškození DNA, které mohou vznikat působením UV záření či chemickými mutageny (Slyskova, Sabatella et al. 2018). NER opravná dráha pracuje dvěma různými mechanismy: GG-NER mechanismus (global genome NER), který zajišťuje opravu poškození kdekoli v genomu a TC-NER mechanismus (transcription-coupled NER; oprava spojená s transkripcí), který je dominantní především u poškození blokujících RNA polymerázu (Christmann, Tomicic et al. 2003). V případě TC-NER poškozené místo způsobí zastavení RNA polymerázy (RNAP2), což vede k nasednutí proteinů UVSSA, CSB a CSA. U GG-NER je poškození rozpoznáno komplexem UV-DDB a XPC/RAD23B/CETN2 (Schärer 2013), které interagují s helikázami XPB a XPD, jež se pohybují až k místu poškození, kde se zastaví a umožní se tak nasednutí XPA, RPA a XPG. Obě cesty NER po detekci poškození využívají stejných excizních proteinů, komplexu endonukleáz XPG a ERCC1-XRF, které rozštěpí DNA okolo poškození a vyštěpí 25 – 30 bází. Následně DNA polymeráza δ/ϵ , ligáza 3 a ERCC3 dosyntetizují odstraněný úsek a spojí volné konce DNA (Slyskova, Sabatella et al. 2018).

Deficit některých proteinů dráhy excizní reparace způsobený bilaterální mutací/mutacemi v příslušných genech se manifestuje autozomálně recesivním syndromem. Ztráta proteinů XPx je příčinou geneticky heterogenního onemocnění Xeroderma pigmentosum (MIM 278700; 278780; 610651; 278730), ztráta proteinů CSA a CSB se manifestuje jako autosomálně recesivní Cockaynův syndrom (MIM 216400; 133540).

Oprava nesprávně spárovaných bází (MMR)

MMR opravná dráha je zodpovědná za rozeznání a následnou opravu poškození DNA vzniklé deaminací, oxidací a replikačními chybami (inzerce, delece, špatně zařazená báze obvykle v důsledku tautomerizace), ale také opravuje DNA dimery a alkylované báze (Duval and Hamelin 2002). MMR tak zvyšuje až 1000krát přesnost replikace v dceřiném řetězci DNA (Hsieh and Yamane 2008). Poškození DNA je rozpoznáno komplexem MutS α (složeným z MSH2 a MSH6) nebo MutS β (složeným z MSH2 a MSH3). MutS α se rozpoznává nesprávně spárované báze, případně inserce nebo delece, zatímco MutS β rozpoznává především inserce a

delece. Vazba MutS α a MutS β indukuje nasednutí komplexu hMutL α (složeného z MLH1 a PMS2) (Scartozzi, De Nictolis et al. 2003, Cooke and Brenton 2011, Slyskova, Sabatella et al. 2018). Důležitou úlohu v nasedání MSH6 a MSH3 zřejmě hraje interakce s PCNA. Endonukleáza PMS2 po aktivaci (ATP) a interakci s dalšími proteiny (PCNA, RFC) vytváří zlomy, které jsou důležité pro rozpoznání nově syntetizovaného řetězce DNA. Exonukleáza (EXO1) následně vyštěpí část dceřiného řetězce, jež je poté dosyntetizována DNA polymerázou δ a volné konce jsou spojeny ligázou (Hsieh and Yamane 2008).

Proteinové produkty genů účastnících se MMR dráhy byly poprvé identifikovány v souvislosti s dědičným nepolypózním karcinomem kolorekta (HNPCC, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer; MIM 120435; 609310; 614350; 614337) označovaným jako Lynchův syndrom (Scartozzi, De Nictolis et al. 2003). Zárodečné mutace v MMR genech výrazně zvyšují celoživotní riziko vzniku karcinomu kolorekta (více než 72%), endometria (více než 42%) a ovaria (12%) (Watson and Lynch 2001).

Oprava dvouřetězcových zlomů

Dvouřetězcové zlomy jsou nejzávažnějším typem poškození DNA, které v buňkách vzniká endogenně metabolickými reakcemi či replikačním stresem, ale může být indukováno exogenně působením některých mutagenů, zejména ionizujícím zářením (Mehta and Haber 2014). Pro některé fyziologické procesy je tvorba DSBs programově indukována (např. V(D)J rekombinace). V každé buňce endogenně vznikne v průběhu buněčného cyklu přibližně 50 DSBs (Vilenchik and Knudson 2003), přičemž většina endogenně vzniklých DSBs vzniká v kontextu DNA replikace (Syeda, Hawkins et al. 2014). Pro zachování integrity chromozomů je nutná jejich oprava, která je realizována dvěma hlavními mechanismy: homologní rekombinací a nehomologním spojováním konců, eventuálně je možná oprava DSBs alternativním spojováním konců. Homologní rekombinace vyžaduje přítomnost sesterské chromatidy a je proto omezena pouze na S a G2 fázi buněčného cyklu, zatímco NHEJ nevyžaduje komplementární templát a může probíhat v průběhu celého buněčného cyklu, nicméně je dominantním mechanismem opravy DSB v G0 a G1 fázi. Na rozdíl od poměrně přesné homologní rekombinace je NHEJ nepřesné, protože dochází ke přímému spojení volných konců vláken DNA i za cenu změny v původní sekvenci. Alternativní spojování konců (A-EJ) zahrnuje účast genů BER dráhy a probíhá v S a G2 fázi buněčného cyklu, kdy doplňuje HR nebo jí kompenzuje při jejím selhání. A-EJ využívá krátké mikrohologní sekvence, vede k velkým excizím DNA a velké chybovosti.

NEHOMOLOGNÍ SPOJOVÁNÍ KONCŮ (NHEJ)

Celý proces v klasické DNA-PK (DNA dependentní protein kináza) dependentní NHEJ opravné dráze začíná vazbou heterodimeru Ku70/Ku80 na konce zlomu vlákna DNA. Tato vazba je iniciována fosforylací histonu H2AX. Následuje vazba DNA-PK na DNA a aktivace vlastní podjednotky se serin/treoninovou kinázovou aktivitou. Komplex Ku70/Ku80/DNA-PK označovaný jako DNA-PK poté drží konce vlákna u sebe a aktivovaná DNA-PK umožní zarovnání vlákna pomocí nukleázy Artemis. Na vlákno nasedne komplex DNA ligázy IV a XRCC4 ligázy. Tato vazba je stimulována proteinem XLF, který interaguje s XRCC4 a umožňují finální spojení konců (Ahnesorg, Smith et al. 2006, Buck, Malivert et al. 2006, Lieber 2008).

NHEJ je důležitou součástí V(D)J rekombinace, což je mechanismus sestavení variabilních částí imunoglobulinů a receptorů na T lymfocytech (Grawunder, Zimmer et al. 1998). Mutace v genech *XLF* (MIM 611291), *Artemis* (MIM 602450) a *LIG4* (MIM 606593) vedou ke vzniku vzácných hereditárních onemocnění charakterizovaných imunodeficiencí a/nebo vývojovými vadami, což podtrhuje významnost dráhy NHEJ v kontextu genomové integrity a vývoje (Sekiguchi and Ferguson 2006).

HOMOLOGNÍ REKOMBINACE (HR)

Homologní rekombinace je zásadním mechanismem k udržení genomové stability a odehrává se především v S fázi buněčného cyklu. HR je aktivována DSB (Kanaar, Hoeijmakers et al. 1998) a zastavenou replikační vidličkou (McGlynn and Lloyd 2002). Tento způsob opravy DSB je pro buňku nejpřesnější, protože jako templát je využívána sesterská chromatida. Vznik DSB vede k aktivaci kináz ATM (ataxia telangiectasia-mutated) a ATR (ATM and Rad3 related), které spouštějí kaskádovitou fosforylací dalších proteinů, mimo jiné kinázy CHK2 a proteinu p53, a ve svém důsledku vedou k aktivaci kontrolního bodu a iniciaci opravy DSB (Jacquemont and Taniguchi 2007). Aktivovaná ATM kináza fosforyluje histon H2AX a další substráty včetně proteinu NBN, BRCA1 a FANCD2 (Jacquemont and Taniguchi 2007, Hartlerode and Scully 2009). Protein BRCA1 navádí MRN komplex (RAD50-MRE11-NBN) na 3' konec zlomu, který řadou konformačních změn na poškozeném vlákně zpětnovazebně aktivuje ATM kinázu (Paull and Lee 2005). V místě DSB dojde k resekci vlákna od 5' k 3' konci. 3' konce jsou rozpoznány a stabilizovány proteinem RPA, který se váže na jednořetězcovou DNA a rozvolňuje její sekundární strukturu (Sung and Klein 2006). Poté BRCA2 protein

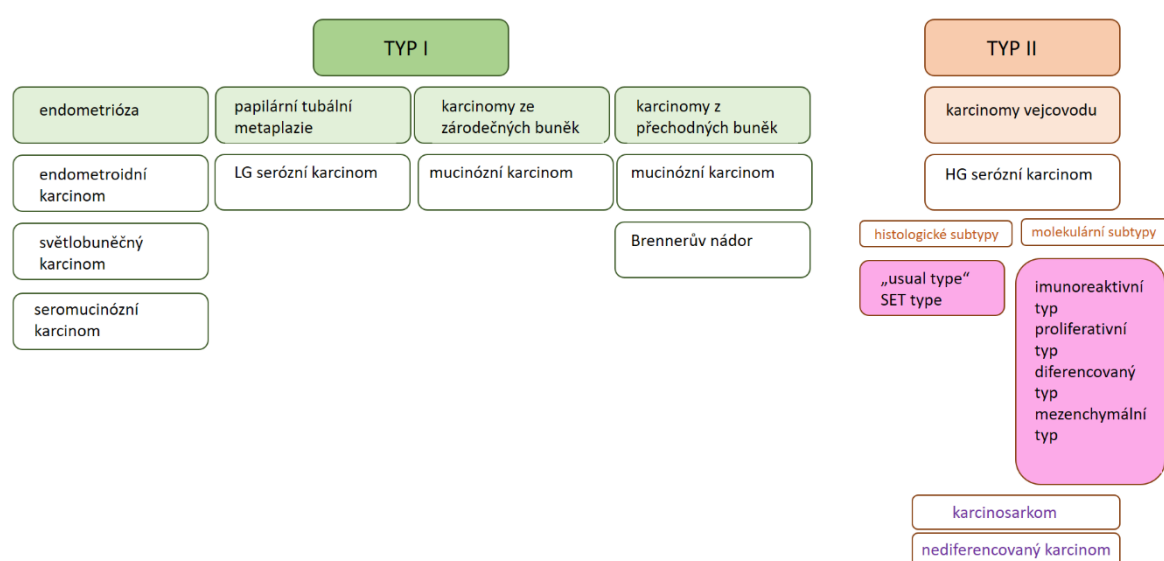
zprostředkuje vazbu rekombinázy RAD51, která nahradí RPA protein (Davies, Masson et al. 2001). Funkcí proteinu BRCA2 v reparaci DNA a rekombinaci je tedy především kontrola přítomnosti, lokalizace a stabilizace proteinu RAD51, (Davies, Masson et al. 2001, Ayoub, Rajendra et al. 2009, Shivji, Mukund et al. 2009). Takto aktivovaný 3' konec vlákna DNA za asistence dalších proteinů (RAD52) invaduje do komplementární sekvence sesterské chromatidy. Vytvoří se struktura zvaná D smyčka, ve které se invadující řetězec páruje s komplementárním vláknem a dochází k syntéze nové části vlákna s využitím duplexní DNA jako templátu (Sung and Klein 2006, Hartlerode and Scully 2009, Mehta and Haber 2014). Pokud D smyčka zachytí druhý konec zlomu, vytvoří se Hollidayova struktura (Sung and Klein 2006, Hartlerode and Scully 2009). Hollidayova struktura může být poté rozštěpena několika enzymovými komplexy, jako je BLM v komplexu s topoizimerázou III α nebo endonukleáza GEN1, která štěpí v místě uzlu symetricky (Taylor, Harnden et al. 1975, Ip, Rass et al. 2008).

Bialelické zárodečné mutace v genech kódujících proteiny HR jsou příčinou řady syndromů chromozomální instability. Mezi tato recesivní onemocnění patří Ataxia telangiectasia (deficit ATM; (Taylor, Harnden et al. 1975, Milne 2009); MIM 208900), Ataxia-telangiectasia-like disorder (deficit MRE11; (Taylor, Groom et al. 2004); MIM 604391), Nijmegen Breakage syndrom (deficit NBN; (Digweed and Sperling 2004); MIM 251260) či geneticky heterogenní syndrom Fanconiho anemie (deficit některého z FANCx genů; (Alter 1996); MIM 617243; 616435; 614083; 227646; 600901; 617247; 614082; 227645; 603467; 605724; 617244; 609053; 613951; 615272; 610832; 617784; 227650; 617883; 613390; 609054; 300514).

Monoalelické zárodečné mutace v genech HR jsou příčinou některých dědičných nádorových syndromů s autozomálně dominantní dědičností. Mechanismus HR se stal důležitou součástí nádorového výzkumu ovariálních karcinomů po objevu tumorsupresorových genů *BRCA1* a *BRCA2* (King, Marks et al. 2003), hlavních predispozičních genů pro syndrom dědičného karcinomu prsu a ovaria (Gayther, Russell et al. 1999) (MIM 604370; 612555), mutace v *BRCA1* a *BRCA2* jsou však asociovány i s rizikem vzniku dalších nádorových onemocnění (Schutte, da Costa et al. 1995, Howlett, Taniguchi et al. 2002, Edwards, Kote-Jarai et al. 2003, Reid, Renwick et al. 2005, Al-Sukhni, Rothenmund et al. 2008, Sawyer, Tian et al. 2015)).

Karcinom ovaria

Maligní ovariální nádory představují asi 30% maligních nádorů vznikajících v oblasti vnitřního genitálu a jsou druhou nejčastější skupinou po nádorech děložního těla. Jedná se o heterogenní onemocnění. Přibližně 90% nádorů je odvozených od epitelálních buněk a pouze malá část nádorů pochází z germinálních buněk či buněk stromatu a zárodečných pruhů (Prat 2014). Dualistický model ovariální karcinogeneze dělí epitelální karcinomy ovaria do dvou skupin skupin, typ I a typ II (Obrázek 2) (Shih Ie and Kurman 2004, Kurman and Shih Ie 2016).



Převzato a upraveno dle (Kurman and Shih Ie 2016)

Obrázek 2 - model vzniku karcinomu vaječníků. Karcinomy vaječníků pocházejí z endometriální tkáně, tkáně vejcovodů, zárodečných buněk a přechodného epitelu. Karcinomy typu I zahrnují karcinomy endometroidní, světlobuněčné, LG serózní a mucinózní. Seromucinózní karcinomy a maligní Brennerovy nádory jsou vzácné. Seromucinózní karcinomy se označují také jako smíšené Müllerovy nádory. Karcinomy typu II jsou nejčastější HG serózní karcinomy a mnohem vzácnější karcinosarkomy a nediferencované karcinomy.

Nádory I. typu jsou méně časté, vznikají z prekurzorové léze a jsou charakterizovány pomalejší progresí a vyšším pětiletým přežitím. Karcinomy II. typu vznikají na rozdíl od I. typu rychle jsou obvykle diagnostikovány v pozdějších stádiích, tvoří většinu případů diagnostikovaných karcinomů ovaria a mají horší prognózu (Bouda J 2018).

Histopatologická klasifikace

Nejčastějším typem maligních nádorů jsou epiteliální nádory odvozené z povrchového epitelu ovaria, které představují téměř 90% maligních nádorů ovarií. Germinální ovariální karcinomy, nádory z buněk ovariálního stromatu (gonadostromální) a smíšené nádory jsou řádově méně časté (~10%) a postihují mladší ženy a dívky. Jiné typy maligních nádorů (např. lymfoidní, sarkomy, sekundární nádory) se vyskytují vzácně ("guidelines pro karcinom vaječníků a vejcovodu" ; Masarykův onkologický ústav, 2019).

Nejčastějším typem epiteliálního karcinomu ovaria je serózní karcinom, který představuje okolo 50% maligních ovariálních nádorů, následují endometroidní (15-20%), mucinózní (10%) a světlóbuněčný (7%) karcinom, a mezi nejméně časté patří maligní Brennerův tumor, nediferencovaný a neklasifikovatelný karcinom (Dundr 2010). Low-grade serózní (LGS) karcinomy představují asi 15% serózních karcinomů a jsou méně agresivní než high-grade serózní tumory (HGS) (Herrington 1999).

Speciální skupinou ovariálních nádorů jsou neinvazivní borderline tumory s nejasným maligním potenciálem (Fischerova, Zikan et al. 2012), které jsou obvykle diagnostikovány v nižším stádiu a mají lepší prognózu (Tabulka 1).

	BTO	Invazivní karcinom
Medián věku manifestace	46	50-60
Podíl nádorů diagnostikovaných ve stádiu I	60-80 %	20-30 %
Metastatické šíření	vzácné	časté a časně
Pětileté přežití ve stádiu I	95-98 %	85-93 %
Pětileté přežití ve stádiu II	86-92 %	60-74 %
Pětileté přežití ve stádiu III	17-33 %	23-41%

Převzato z Onkogynekologie, Cibula, Petruželka a kolektiv

Tabulka 1 – porovnání BTO a invazivních karcinomů ovaria.

Riziko recidivy BTO ve formě invazivního ovariálního karcinomu závisí především na rozsahu provedeného chirurgického výkonu a je vyšší v případě přítomnosti invazivních implantačních metastáz. Na rozdíl od invazivních karcinomů s většinou recidiv do 2 let od ukončení léčby se

recidivy BTO mohou často objevit v dlouhém časovém odstupu od ukončení léčby (Silva, Gershenson et al. 2006).

Stádium onemocnění

Rozsah onemocnění je klasifikován pomocí AJCC (American Joint Committee on Cancer) TNM staging a FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) systému klasifikace, přičemž oba typy klasifikace jsou obdobné. FIGO je založen na chirurgickém stagingu, přičemž TNM je založen na klinické a/nebo patologické klasifikaci (Tabulka 2).

FIGO klasifikace			Definice	TNM stádia	
I				T1	
	A	I	Invazivní nádor omezen na jeden vaječník, pouzdro je intaktní, zevní povrch ovaria není postižen nádorovým růstem, v peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky. Invaze je limitována hloubkou 5 mm a šířkou maximálně 7 mm ve stromě nádoru	T1a	
(nádor omezen pouze na ovarium)		II	Měřitelná invaze stromy je větší než 3 mm ale ne více než 5 mm hluboká a maximální šířka je 7 mm v průměru		
	B	Nádor omezen na oba vaječníky, zbylé podmínky jako IA		T1b	
		I	Klinické léze do 4 cm		

		II	Klinické léze větší než 4 cm		
	C	Nádor omezen na jedno nebo obě ovaria		T1c	
		I	Chirurgicky způsobená ruptura tumoru		
		II	Ruptura pouzdra nebo nádor na povrchu ovaria		
		III	Maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu		
II				T2	
(nádor postihuje jedno nebo obě ovaria s pánevním šířením)	A		Šíření a/nebo implantace na dělohu a/nebo vejcovody, v ascitu/nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky	T2a	
	B		Karcinom ovaria šířící se na další pánevní tkáň, v ascitu/nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky	T2b	
	C		šíření v pánvi (2a nebo 2b) s maligními buňkami v ascitu nebo peritoneálním výplachu	T2c	
III				T3 a/nebo N1	
	A		Pozitivní retroperitoneální mizní uzliny a/nebo mikroskopické	T3a	

		metastáze mimo pánev		
(nádor postihující jeden nebo oba vaječníky s mikroskopickými peritoneálními metastázami mimo pánev a/nebo metastázy v retroperitoneálních mízních uzlinách)	I	Pozitivní pouze retroperitoneální mízní uzliny		
	i	Metastáze ≤ 10 mm		
	ii	Metastáze > 10 mm		
	II	Mikroskopické peritoneální metastázy mimo pánev \pm pozitivní retroperitoneální mízní uzliny		
	B	Makroskopické peritoneální metastázy mimo pánev ≤ 2 cm \pm pozitivní retroperitoneální mízní uzliny, spolu s rozšířením do kapsule extranodálních orgánů (játra, slezina)	T3b	
	C	Peritoneální metastázy mimo pánev většími než 2cm \pm pozitivní retroperitoneální mízní uzliny, spolu s rozšířením do kapsule extranodálních	T3c a nebo N1	

		orgánů (játra, slezina).	
IV			M1
	A	Pleurální výpotek s pozitivní cytologií	
	B	Metastázy až do extraabdominálních orgánů (včetně lymfatických uzlin a uzlin mimo břišní dutinu)	

převzato a upraveno ze Sobin et al. 2009 (Sobin 2009)

Tabulka 2 - FIGO a TNM klasifikace karcinomu ovaria.

V ČR je téměř u dvou třetin pacientek diagnostikován karcinom ovaria v pokročilém stádiu (III/IV), s čímž souvisí i nepříznivá prognóza. Předléčebná a stagingová vyšetření zahrnují anamnestické a fyzikální vyšetření, probatorní laparotomii s odběrem biopsie, zobrazující vyšetření a laboratorní vyšetření zahrnující krom krevního obrazu a základních vyšetření také stanovení nádorových markerů, především CA125 (Modrá kniha České onkologické společnosti). Sérový CA 125 (také známý jako mucin 16) je glykoprotein z rodiny mucinů s vysokým obsahem sacharidů navázaných přes O–glykosidickou vazbu kódovaný genem *MUC16*.

Prognóza onemocnění závisí na mnoha faktorech, které ovlivňují výběr léčebného postupu a mezi které patří klinické stadium, histologický typ, grading, operační nález a pooperační reziduum. Vliv klinického stadia na pětileté přežití je shrnut v následující Tabulce 3:

	Procento nemocných v daném stádiu v době diagnózy	Pětileté přežití
Stádium I	20,2%	82,1%
Stádium II	7,3%	58,5%
Stádium III	26,3%	25,1%
Stádium IV	28,9%	11,1%
Stádium neznámé	17,3%	

Tabulka 3 - zastoupení klinických stádií u pacientek s diagnostikovaným karcinomem ovaria a pětileté přežití v závislosti na stádiu onemocnění. Klinická stadia jsou určována na základě TNM klasifikace platné v době stanovení diagnózy pacienta. Procento nemocných v daném stádiu je průměr z analýz mezi léty 1977-2017 (zdroj www.svod.cz). Pětileté přežití dle doporučených postupů pro praktické lékaře- karcinom ovaria Česká onkologická společnosti ČLS JEP.

Dědičná predispozice ke karcinomu ovaria

Většina nádorových onemocnění je sporadických a přibližně 5-10% vzniká na základě dědičné predispozice (Nagy, Sweet et al. 2004). U karcinomů ovaria je zastoupení dědičných forem onemocnění vyšší a v naší populaci dosahuje až 30% všech případů (Lhotova, Stolarova et al. 2020).

Celoživotní riziko rozvoje karcinomu ovaria v běžné populaci se pohybuje pod 2% ("guidelines pro karcinom vaječníků a vejcovodu" ; Masarykův onkologický ústav, 2019), avšak u žen s mutací v některém s predispozičních genů může být celoživotní riziko vzniku onemocnění velmi vysoké. Spolu s faktem, že diagnostika časných stádií onemocnění je velmi obtížná, je nutné identifikovat ženy s vysokým či významně zvýšeným rizikem onemocnění. Dle relativního rizika (RR) vzniku onemocnění pro nosičky patogenních mutací dělíme predispoziční geny na geny vysokého rizika ($RR \geq 5$), středního rizika ($RR \geq 2 - <5$) či nezvýšeného/mírně zvýšeného rizika ($RR < 2$) (Gronwald, Lubinski et al. 2019). Ženám s výrazně zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria lze nabídnout preventivní riziko-redukující salpingooforektomii (RRSO), genetické poradenství včetně preimplantační diagnostiky či sledování ve smyslu včasného zachycení možných dalších malignit asociovaných s mutacemi v příslušných predispozičních genech.

Příchod sekvenování nové generace (next generation sequencing; NGS) a jeho zavedení do rutinní praxe umožnilo testování mnoha nádorových predispozičních genů u velkého počtu pacientů při rozumných ekonomických nákladech v porovnání s klasickou „gene-by-gene“ analýzou (Walsh, Casadei et al. 2011). Zároveň tento nový přístup vedl k identifikaci dalších genů a jejich alterací asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění.

Karcinom ovaria je součástí syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria, který se v postižených rodinách může kromě karcinomu prsu a ovaria manifestovat výskytem i dalších nádorů jako je karcinom slinivky a prostaty u mužů. Tuto skutečnost reflektují i aktuální národní indikační kritéria pro testování dědičné formy nádorů prsu a ovarií (modifikovaná dle doporučení NCCN, National Comprehensive Cancer Network (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf)) schválená 2019 Společností lékařské genetiky (Tabulka 4).

Podle aktuálního doporučení NCCN (High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, verze 1.2020 ze 4.12.2019) můžeme predispoziční geny prokazatelně asociované se syndromem dědičného karcinomu prsu a/nebo ovaria rozdělit (s ohledem na riziko čistě ovariálního karcinomu) na geny s prokázaným zvýšením rizika, možným zvýšením rizika a nezvýšeným rizikem vzniku tohoto onemocnění (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf). Prokazatelně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria je spojeno s mutacemi v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *STK11*. Možné zvýšení rizika vzniku karcinomu ovaria je uvažováno pro nosičky mutací v genech *NBN*, *PALB2*, *ATM*, *BARD1*. Pro nosičky mutací v dalších genech pro syndrom dědičného karcinomu prsu a ovaria (*CHEK2*, *TP53*, *CDH1*, *PTEN*, *NF1*) není dle aktuálních NCCN doporučení riziko vzniku karcinomu ovaria zvýšeno či pro něj není dostatek dat (Tabulka 5).

Indikační kritéria pro testování dědičné formy nádorů prsu a ovarií (modifikovaná dle NCCN 2019, schválená společností lékařské genetiky 2019)	
<i>Sporadické formy</i>	<i>familiární formy (karcinom ovaria, tuby nebo primární peritoneální v rodinné anamnéze je vždy indikací k testování)</i>
<ul style="list-style-type: none"> - karcinom ovaria/tuby/peritonea v jakémkoli věku - triple negativní karcinom (receptory ER, PR a HER2 negativní) prsu do 60 let- medulární karcinom prsu se téměř vždy shodují s triple negativním karcinomem prsu (triple-negative breast cancer- TNBC) - unilaterální karcinom prsu do 45 let (do 50 let, pokud není známá rodinná anamnéza) - dva samostatné primární karcinomy prsu, první do 50 let, nebo oba do 60 let (bilaterální nebo ipsilaterální/synchronní nebo metasynchronní) - duplicita karcinomu prsu a slinivky v jakémkoli věku - karcinom prsu u muže v jakémkoli věku 	<ul style="list-style-type: none"> - alespoň 3 příbuzní (včetně probandky) s karcinomem prsu v jakémkoli věku - 2 příbuzní (včetně probandky) s karcinomem prsu, alespoň jedna diagnostikovaná ve věku do 50 let, nebo obě do 60 let (empirické riziko karcinomu prsu je pro příbuzné nad 20% tj. vysoké, a je doporučena magnetická rezonance (magnetic resonance imaging – MRI) prsou - probandka s karcinomem prsu v jakémkoli věku a příbuzný s: <ul style="list-style-type: none"> - karcinomem ovaria - TNBC/medulárním karcinomem prsu - karcinomem prsu u muže - karcinomem slinivky - high-grade (Gleason skóre ≥ 7) nebo primárně metastatickým karcinomem prostaty - zjištění somatické mutace v tumoru (mutace IARC (International Agency for Research on Cancer) class 4-5 – mutace pravděpodobně patogenní nebo patogenní) v genech asociovaných s hereditárním karcinomem prsu a ovaria v tumoru (prsu, ovaria, ale i jiných typech nádorů).

převzato a upraveno z Foretova a kol. 2019 (Foretova, Navratilova et al. 2019)

Tabulka 4 - indikační kritéria pro testování dědičné formy nádorů prsu a ovarií (modifikovaná dle NCCN 2019, schválená společností lékařské genetiky 2019).

GEN	CELOŽIVOTNÍ RIZIKO VZNIKU KARCINOMU OVARIA
<i>BRCA1</i>	35–60 %
<i>BRCA2</i>	12–25 %
<i>MLH1</i>	4-20%
<i>MSH2/EPCAM</i>	8-38 %
<i>MSH6</i>	1-13 %
<i>PMS2</i>	3 %
<i>BRIP1</i>	6–15 %
<i>RAD51C</i>	10–15 %
<i>RAD51D</i>	10–15 %
<i>STK11</i>	18-21%

*dle Soukupová et al. 2019 (Soukupova, Lhotova et al. 2019); NCCN guidelines version 1.2020 Lynch syndrome; NCCN guidelines version 1.2021 Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast Ovarian, and Pancreatic

Tabulka 5 - riziko vzniku karcinomu ovaria pro mutace v genech asociovaných se vznikem karcinomu ovaria.

Doporučení péče o nosičky mutací v predispozičních genech závisí na penetranci těchto genů, tedy na výši rizika vzniku karcinomu ovaria u nosiček mutací. Národní doporučení vycházejí z mezinárodních doporučení NCCN (Tabulka 6). Nejpodrobněji jsou zpracována národní doporučení pro péči o nosičky mutací *BRCA1/2* (Zikán 2016, Foretova, Navratilova et al. 2019).

Gen	Riziko karcinomu prsu/ prevence	Riziko karcinomu ovaria / RRSO	Jiná doporučení / PGD / predikce / AR poradenství / testování partnera
<i>ATM</i> gen pro AR Ataxia teleangiectasia (1 : 100)	až 69 % missense mutace c.7271C>G/p.Val2424Gly – dominantně negativní efekt až 40 % ostatní patogenní mutace RRM dle situace a RA	RRSO ne	jiná rizika – prevence dle RA (GIT, prostata) zvýšená senzitivita k radiaci nebyla prokázána poradenství – riziko AR syndromu u potomků/ testování partnera ano, PGD při pozitivitě prediktivní testování příbuzných
<i>CDH1</i> hereditární difuzní karcinom žaludku	lobulární karcinom především / 39–52 % RRM dle situace a RA	neprokázáno	dif. karcinom žaludku – gastroskopie/gastrektomie PGD prediktivní testování příbuzných
<i>CHEK2</i>	až 40 % patogenní varianty RRM dle situace a RA u missense variant jen UZ/MMG ročně	RRSO ne	jiná rizika – dle RA, kolorektum? prediktivní testování příbuzných (ne u nízké rizikové mutace CHEK2 c.470T>C/ p.Ile157Thr – prevence jen u homozygotů a dle RA)
<i>NF1</i> neurofibromatóza typ 1	až 30 %, vysoké riziko do 50 let věku, dále střední riziko 30– 50 let UZ nebo MMG/MRI > 50 let MMG ročně RRM dle situace a RA	neprokázáno	neurofibromy, neurinomy, gliomy, meningiomy, GIST, sarkomy, neuroblastomy, leukemie aj., celotělové MRI PGD prediktivní testování příbuzných, i v dětství
<i>PALB2</i> gen pro AR-FANCN (< 1 : 2 000)	40–60 % RRM možná	RRSO dle RA	pankreas – EUS/MRI, prostata, možné spektrum karcinomů jako u BRCA2 prediktivní testování příbuzných poradenství pro recesivní syndrom ne
<i>PTEN</i> syndrom Cowdenové	25–50 % RRM možná	neprokázáno hysterektomie (28% riziko karcinomu dělohy) po dětích	kolorektum, štítnice, děloha, ledviny, melanomy aj. PGD prediktivní testování příbuzných
<i>STK11</i> Peutz- Jeghersův syndrom	45–50 % RRM dle situace a RA	non epiteliální RRSO	slinivka, kolorektum, žaludek, plic, čípek, ovária, testes PGD prediktivní testování příbuzných, i v dětství
<i>TP53</i> Li-Fraumeni syndrom	50–90 % RRM možná	?	CNS, nadledviny, prsu, sarkomy, leukemie, melanomy, žaludek, kolorektum aj. celotělové MRI PGD prediktivní testování příbuzných, i v dětství

převzato a upraveno dle Foretová et al.2019 (Foretova, Navratilova et al. 2019)

Tabulka 6 - doporučení preventivní péče a prediktivního tetování u genů vysokého rizika pro karcinom prsu v souvislosti s karcinomem ovaria. **Vysvětlivky:** **RRSO** – risk redukující salpingo-oophorektomie, **PGD** – preimplantační genetická diagnostika, **AR** – autozomálně recesivní, **RRM** – risk redukující mastektomie, **RA** – rodinná anamnéza, **UZ** – ultrazvukové vyšetření, **MMG** – mamografické vyšetření, **MRI** – magnetická rezonance, **GIT** – gastrointestinální soustava, **GIST** – gastrointestinální stromální tumor, **EUS** – endoskopická ultrasonografie, **CNS** – centrální nervová soustava

Geny asociované s vysokým/významně zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria

BRCA1 a BRCA2

Geny *BRCA1* (Breast Cancer 1 Gene, MIM 113705) a *BRCA2* (Breast Cancer 2 Gene, MIM 600185) jsou hlavními predispozičními geny dědičného karcinomu prsu a/nebo ovaria. Gen *BRCA1*, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 17 v pozici 21.31 byl identifikován v roce 1994 a krátce nato v roce 1995 následoval gen *BRCA2* který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 13 v pozici 13.1 (Miki, Swensen et al. 1994, Wooster, Bignell et al. 1995). Proteinové produkty těchto genů hrají důležitou roli především v opravě dvouřetězcových zlomů DNA mechanismem homologní rekombinace. *BRCA1/2* se podílí na udržování integrity genomu, ochraně replikační vidličky a na opravě meziřetězcových spojů prostřednictvím Fanconi anemia (FA) cesty (Ceccaldi, Sarangi et al. 2016, Nielsen, van Overeem Hansen et al. 2016). Mutace v *BRCA1/2* jsou asociovány s vysokým celoživotním rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria (Tabulka 5) (Antoniou, Pharoah et al. 2003, Chen and Parmigiani 2007, Kuchenbaecker, Hopper et al. 2017). Nosičky mutací v těchto genech mají 10 – 30x zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu oproti běžné populaci. Riziko se zvyšuje s věkem, výrazněji u nosiček mutací v genu *BRCA1* (Antoniou, Pharoah et al. 2003). Riziko vzniku karcinomu ovaria je výrazně vyšší u nosiček mutací v genu *BRCA1* ve srovnání s genem *BRCA2*. U nosiček *BRCA1* mutací dosahuje riziko vzniku karcinomu ovaria do 80. roku života 44%, u nosiček mutací v *BRCA2* 17%. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu dosahuje v případě *BRCA1* nosiček 72%, *BRCA2* pak 69% (Kuchenbaecker, Hopper et al. 2017). Prevalence mutací v *BRCA1/2* v rodinách hereditární formou karcinomu prsu a ovaria (hereditary breast and ovarian cancer; HBOC) se liší mezi populacemi a závisí na rodinné nádorové historii (Kast, Rhiem et al. 2016). Mutace v genech *BRCA1/2* jsou v případě vzniku karcinomu ovaria asociovány především s HG serózními karcinomy (Mavaddat, Barrowdale et al. 2012). Pro nosičky mutací v genech *BRCA1/2* je krátkodobé přežití lepší než u nenosiček, nicméně z pohledu dlouhodobého přežití je naopak přežití *BRCA1/2* pozitivních pacientek horší než u nenosiček (Candido-dos-Reis, Song et al. 2015, Zikán 2016).

Zatímco heterozygotní mutace v těchto hlavních vysokopenetrančních genech jsou spojeny s nádorovou predispozicí, zejména s rizikem vzniku karcinomu prsu a ovaria, bialelické mutace (homozygot nebo složený heterozygot) v těchto genech jsou příčinou Fanconiho anemie

komplementační skupiny D1 (FANCD1; *BRC42*, MIM 605724) a S (FANCS; *BRC41*, MIM 617883) (Ceccaldi, Sarangi et al. 2016, Walsh, Chang et al. 2017).

RAD51C

Gen *RAD51C* (MIM 602774) byl poprvé identifikován v rodině s FA komplementační skupiny O (FANCO; MIM 613390) (Vaz, Hanenberg et al. 2010). V savčích buňkách je gen *RAD51C* jedním z pěti paralogů rodiny *RAD51*, která kóduje proteiny podílející se na transferu DNA vláken při HR. *RAD51C* je lokalizován na chromozomu 17q23, podílí se na HR (Takata, Sasaki et al. 2001) a je vyžadován pro aktivaci kinázy CHK2 (Badie, Liao et al. 2009). Během opravy dvouřetězcového zlomu mechanismem HR funguje jako součást dvou komplexů. První tvoří s dalším paralogem *RAD51 XRCC3*, s kterým se společně váží na jednořetězcovou DNA a následně napomáhají formaci DNA-proteinové sítě (Masson, Stasiak et al. 2001) a Hollidayovy struktury (Liu, Masson et al. 2004). Druhý komplex je složen z proteinů *XRCC2*, *RAD51B* a *RAD51C*, u kterého přesná funkce není známá, ale předpokládá se, že hraje roli v akumulaci *RAD51* proteinů do místa poškození DNA (Thacker 2005).

RAD51C byl původně označován za gen predisponující ke vzniku karcinomu prsu a ovaria (Meindl, Hellebrand et al. 2010). Většina počátečních studií, které chtěly potvrdit hypotézu o novém predispozičním genu HBOC, selhala s tím, že mutace v genu *RAD51C* jsou velmi vzácné (Akbari, Tonin et al. 2010, Zheng, Zhang et al. 2010). Až studie provedená Lovedayem a kolektivem potvrdila asociaci mutací v genu *RAD51C* s karcinomem ovaria ($RR = 5,88$, 95% $CI = 2,91-11,9$, $p = 7,65 \times 10^{-7}$) a stanovila kumulativní riziko přesahující 9% v 80 letech věku (Loveday, Turnbull et al. 2012).

RAD51D

Gen *RAD51D* (MIM 02954) byl identifikován na konci 90. let, jako další z členů rodiny *RAD51*, které jsou nezbytné pro reparaci DNA a meiotickou rekombinaci (Pittman, Weinberg et al. 1998). Gen *RAD51D* je lokalizován na chromozomu v pozici 17q12 a jeho proteinový produkt se váže do komplexu s proteinem *XRCC3* (Masson, Tarsounas et al. 2001) a spolu katalyzují homologní párování dvouřetězcové DNA a jednořetězcové DNA během HR (Kurumizaka, Ikawa et al. 2002). Protein *RAD51D* se zřejmě rovněž podílí na ochraně konců telomer (Tarsounas, Munoz et al. 2004).

Skupina Loveday a kol. ve své studii v roce 2011 identifikovala 8 patogenních variant u 911 HBOC rodin a jednu u 1060 kontrol, s vyšší prevalencí u rodin s více než jedním případem karcinomu ovaria. Všechny 8 nalezených mutací vedlo ke zkrácení proteinové produktu. Frekvence mutací byla nejvyšší v rodinách s výskytem jednoho a více případů karcinomu ovaria. Na základě těchto zjištění bylo stanoveno RR pro karcinom ovaria pro nosičky mutací v *RAD51D* na 6,3 (95%CI= 2,86-13,85; $p=4,8 \times 10^{-6}$) (Loveday, Turnbull et al. 2011). Vysoké riziko vzniku karcinomu ovaria pro nosičky mutací v *RAD51D* potvrdila i další studie v souboru 3 429 pacientek s invazivním epiteliálním karcinomem ovaria a 2 772 kontrol s OR pro karcinom ovaria 12 (95% CI= 1,5 - 90; $p= 0,019$) (Song, Dicks et al. 2015).

Geny MMR – Lynchův syndrom

Mutace v genech MMR (*MLH1* (MIM 120436), *MSH2* (MIM 609309), *MSH6* (MIM 600678), *PMS2* (MIM 600259), delece 3' konce genu *EPCAM* (MIM 185535) vedoucí k umlčení transkripce *MSH2* jsou spojeny s Lynchovým syndromem. Lynchův syndrom (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) je autozomálně dominantní dědičné nádorové onemocnění, které je charakterizováno především vysokým rizikem vzniku kolorektálního karcinomu (50-70%), u žen také vysokým celoživotním rizikem vzniku endometriálního (kumulativní riziko 30 – 40%) a ovariálního (kumulativní riziko 6-14%) karcinomu (Barrow, Hill et al. 2013, Sehgal, Sheahan et al. 2014). Karcinomy ovaria u pacientek s Lynchovým syndromem jsou typicky endometroidní tumory se vznikem v nižším věku v porovnání se sporadickými nádory či nádory asociovanými s mutacemi v genech *BRCA1/2* (Helder-Woolderink, Blok et al. 2016), bývají diagnostikovány v nižších stádiích a mají lepší prognózu (Watson and Lynch 2001).

BRIP1

Gen *BRIP1* (BRCA1 interacting protein C-terminal helicase1, MIM 605882) alternativní názvy *BACH1*, *FANCF*) patří do rodiny FA, komplementační skupiny J (MIM 609054) (Levitus, Waisfisz et al. 2005). Gen *BRIP1* byl poprvé objeven jako přímý interaktor s proteinem BRCA1 (Cantor, Bell et al. 2001). Protein BRIP1 patřící do RecQ DEAH rodiny je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 17q22, Protein BRIP1 se podílí na udržování genomové integrity regulací odpovědi na replikační stres, podílí se na HR a opravě meziřetězcových spojů (interstrand crosslinks; ICL) (London, Barber et al. 2008). Po navázání na protein RPA odstraňuje proteiny navázané na DNA, čímž stabilizuje replikační vidličku (Gupta, Sharma et al. 2007). Zároveň BRIP1 interaguje s MLH1 a společně lokalizují místa DNA spojů, rozvolňují DNA a restartují zastavenou replikační vidlici (Peng, Litman et al. 2007). Prvotní důkaz

klinické významnosti ve vztahu k HBOC bylo objevení zárodečné mutace u pacientek s karcinomem prsu negativně testovaných na mutace v *BRCA1/2* (Seal, Thompson et al. 2006, Rafnar, Gudbjartsson et al. 2011). Na základě segregáčních analýz a case-control analýzy bylo pro nosičky zárodečných mutací v *BRIP1* stanoveno RR vzniku karcinomu ovaria na 3,4 a kumulativní riziko na 5,8% v 80 letech věku (Ramus, Song et al. 2015).

STK11

Gen *STK11* (Serin/Threonin kinase 11, MIM 602216) je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 19 v pozici 13.3 a kóduje kinázu, která se podílí na regulaci energetického metabolismu a určení polarity buňky (Xu, Jin et al. 2013). Mutace v genu *STK11* jsou asociovány se vznikem Peutz-Jeghersova syndromu (PJS, MIM 175200). Toto onemocnění patří mezi familiární gastrointestinální polypózy, skupinu hereditárních nádorových syndromů, a je charakterizováno výskytem slizničních a kožních hyperpigmentací, vývojem gastrointestinálních polypů a zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění, zejména v oblasti gastrointestinálního traktu a karcinomu prsu u žen. Odhadované kumulativní riziko pro karcinom prsu u pacientek s PJS je 31%-54% ve věku 60 let (Beggs, Latchford et al. 2010). PJS je spojen se zvýšeným rizikem vzniku neepiteliálního karcinomu ovaria (Banno, Kisu et al. 2013).

Geny asociované s možným zvýšením rizika vzniku karcinomu ovaria

ATM

Gen *ATM* (Ataxia-Telangiectasia Mutated Gene, MIM 607585) kóduje serin/threonin kinázu z rodiny fosfatidylinositol-3- kináz a je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 11 v pozici 22.3. Má klíčovou úlohu v iniciaci oprav DSB (Nielsen, van Overeem Hansen et al. 2016). Mutace *ATM* v heterozygotním stavu jsou asociovány se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (OR=2,78) (Couch, Shimelis et al. 2017), asociaci se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria nelze vyloučit (Daly, Pilarski et al. 2017, Lilyquist, LaDuca et al. 2017, Kurian, Ward et al. 2019). Bialelické mutace jsou příčinou neurodegenerativního, autozomálně recesivního onemocnění ataxia-telangiectasia (MIM 208900), které je charakterizováno ataxií, vznikem telangiectazií, imunodeficiencí a zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění, především leukémie a lymfomů (van Os, Roeleveld et al. 2016, Walsh, Chang et al. 2017).

BARD1

Gen *BARD1* (BRCA1-associated RING domain protein, MIM 601593) kóduje protein, který sdílí jak strukturní, tak funkční podobnost s BRCA1, se kterým vytváří heterodimerní strukturu. Tvorba heterodimeru je esenciální pro některé tumorsupresorové funkce proteinu BRCA1 a stabilizaci obou proteinů (Wu, Wang et al. 1996). Gen *BARD1* je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 2 v pozici 35. Protein BARD1 je lokalizován v jádře a jeho tkáňová distribuce je obdobná jako u BRCA1. Oba proteiny mají nejvyšší koncentraci v aktivně proliferujících buňkách (např. varlata), ale také v buňkách podléhajících apoptóze (Marquis, Rajan et al. 1995, Ayi, Tsan et al. 1998). Nízká hladina BRCA1 vede k akumulaci BARD1 v cytoplazmě a iniciaci apoptózy (Irminger-Finger and Leung 2002, Jefford, Feki et al. 2004). Patogenní mutace v genu *BARD1* byly asociovány se středně zvýšeným celoživotním rizikem vzniku karcinomu prsu (>20%), asociace s rizikem vzniku karcinomu ovaria je nejasná (Ratajska, Antoszewska et al. 2012, Couch, Shimelis et al. 2017, Weber-Lassalle, Borde et al. 2019, Hu, Polley et al. 2020).

NBN

Gen *NBN* (MIM 602667), lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 8 v pozici 21.3, kóduje protein nibrin - jednu ze složek evolučně konzervovaného MRN komplexu (MRE11-RAD50-NBN) (Carney, Maser et al. 1998). MRN komplex se podílí na rozpoznání DSB a iniciaci jejich opravy aktivací kinázy ATM kterou aktivuje (Villa, Cassani et al. 2016). Po vzniku DSB je MRN lokalizován do míst poškození, kde NBN stimuluje nukleázovou aktivitu MRE11 (Cannavo and Cejka 2014, Anand, Jasrotia et al. 2019). RAD50 se váže na konce DNA a udržuje je v těsné blízkosti (de Jager, van Noort et al. 2001, Syed and Tainer 2018, Casari, Rinaldi et al. 2019). Zárodečné mutace v genu *NBN* v heterozygotním stavu jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (Gorski, Debniak et al. 2003), non-Hodgkinova lymfomu (MIM 605027) (Steffen, Maneva et al. 2006), karcinomu prostaty (Cybulski, Wokolorczyk et al. 2013) a pankreatu (Borecka, Zemankova et al. 2016), asociace s rizikem vzniku karcinomu ovaria je nejasná. Bialelické mutace v *NBN* jsou příčinou Nijmegen Breakage syndromu (MIM 251260) (Varon, Vissinga et al. 1998), který je charakterizován radiosenzitivitou, imunodeficiencí, mikrocefálií a růstovou retardací a predispozicí k především lymfoidním malignitám (Seemanová, Jarolim et al. 2007). 90% pacientů je homozygotních pro slovanskou founder mutaci c.657_661delACAAA (Seemanová, Jarolim et al. 2007).

PALB2

Protein PALB2 (Partner And Localizer Of BRCA2) je funkčním partnerem proteinu BRCA2 (Xia, Sheng et al. 2006), je lokalizován v jádře a účastní se reparace DNA mechanismem HR. Gen *PALB2* je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 16 v pozici 12.2 a zárodečné mutace *PALB2* (MIM 610355) v heterozygotním stavu jsou spojeny především se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (kumulativní riziko do 80. let 53%) a pankreatu (kumulativní riziko do 80. let 2-3%) (Yang, Leslie et al. 2020). Zvýšení rizika vzniku karcinomu ovaria pro nosičky *PALB2* mutací nelze vyloučit (Ramus, Song et al. 2015, Yang, Leslie et al. 2020). Bialelické mutace jsou příčinou Fanconiho anemie komplementační skupiny N (FANCN, MIM 610832) (Xia, Dorsman et al. 2007).

Geny asociované se syndromem dědičného karcinomu prsu/ovarí, avšak s nestanoveným/nezvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria

CHEK2

Gen *CHEK2* (Checkpoint Kinase 2, MIM 604373), lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 22 v pozici 12.1, kóduje serin-threonin proteinkinázu CHK2, která je aktivována ATM jako odpověď na DSB. Aktivovaná CHK2 fosforyluje řadu jaderných proteinů odpovědi na DSB včetně BRCA1, BRCA2 a p53 (Zannini, Delia et al. 2014, Kleiblova, Stolarova et al. 2019). Zárodečné patogenní mutace v heterozygotním stavu jsou spojeny se především zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (Kleiblova, Stolarova et al. 2019, Hu, Polley et al. 2020), dále pak se zvýšeným rizikem karcinomu štítné žlázy, kolorekta, ledvin či maligního melanomu, výše rizika vzniku karcinomu ovaria je otázná (Kleiblova, Stolarova et al. 2019).

TP53

TP53 (tumor protein 53, MIM 191170) lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 17 v pozici 13.1, kóduje transkripční faktor s potenciálem ovlivňovat expresi genů regulujících průběh buněčného cyklu, indukci apoptózy a změny genové exprese, má klíčovou úlohu v udržování integrity a stability genomu (Lane and Levine 2010). Aktivuje se v rámci odpovědi na stresové signály jako je například poškození DNA, hyperproliferační signály či oxidativní stres (Silwal-Pandit, Langerød et al. 2017). Zárodečné mutace jsou příčinou autozomálně dominantního dědičného nádorového Li-Fraumeni syndromu (MIM 151623) (Malkin, Li et al. 1990), který je charakterizován vysokým rizikem vzniku nádorů již od dětského věku.

Nejčastěji se vyskytují časně nádory prsu, mozku, sarkomy, leukémie a karcinomy nadledvinek, u nosičů mutace v *TP53* se však mohou vyskytovat jakékoliv nádory (Palmero, Achatz et al. 2010, McBride, Ballinger et al. 2014). Pro karcinom prsu bylo definováno OR 7,3 (Hauke, Horvath et al. 2018), riziko vzniku karcinomu ovaria pro nosičky mutací *TP53* je nejasné.

PTEN

Tumorsupresorový gen *PTEN* (phosphatase and tensin homolog, MIM 601728), lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 10 v pozici 23.31, kóduje protein s fosfatázovou aktivitou. Fosfatáza *PTEN* je antagonistou PI3K signální dráhy (fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát) a negativně reguluje MAPK signální dráhu (Pezzolesi, Platzer et al. 2008). Mutace v genu *PTEN* jsou příčinou Cowdenova syndromu (MIM 158350), autozomálně dominantního dědičného nádorového syndromu, které je charakterizováno výskytem mnohočetných hamartomů a vysoký rizikem benigních a maligních tumorů štítné žlázy, prsu a endometria. U některých postižených jedinců se mohou objevit i další symptomy (makrocefalie, kožní či slizniční hamartomatózní léze, a další) (Eng 2003). Celoživotní riziko vzniku karcinomu u žen je pro nosičky mutací v genu *PTEN* 25-50%, v některých pracích publikováno riziko karcinomu prsu až 85% (Nieuwenhuis, Kets et al. 2014, Kleibl and Kristensen 2016). Riziko vzniku karcinomu ovaria není známé.

CDH1

Gen *CDH1* (E-cadherin, MIM 192090) je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 16 v pozici 22.1 a kóduje transmembránový glykoprotein z rodiny kadherinů o velikosti 120 kDa, který je lokalizovaný v plasmatické membráně epiteliálních buněk. Zatímco extracelulární část zprostředkovává buněčnou adhezi, intracelulární doména interaguje s aktinovým cytoskeletem a účastní se signální transdukce (van Roy and Berx 2008). Zárodečné mutace v genu *CDH1* jsou spojeny s dědičným difúzním karcinomem žaludku (MIM 137215). Tento syndrom se v některých rodinách manifestuje lobulárním karcinomem prsu. Kumulativní riziko vzniku karcinomu prsu pro nosičky mutací v *CDH1* se pohybuje okolo 50% (Kaurah, MacMillan et al. 2007, Kleibl and Kristensen 2016). Riziko vzniku karcinomu ovaria není popisováno.

Další geny

U řady rodin s familiárním výskytem karcinomu ovaria a/nebo prsu se nepodaří odhalit příčinu onemocnění. Lze předpokládat, že vznik onemocnění je spojen s privátními mutacemi v dalších genech.

Velká pozornost je soustředěna na geny kódující proteiny DNA reparačních drah, včetně FA signální dráhy. V současné době je známo 22 genů, jejichž patogenní varianty jsou asociovány se vznikem FA: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCJ/BRIP1*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C*, *FANCP/SLX4*, *FANCQ/ERCC4/XPF*, *FANCR/RAD51*, *FANCS/BRCA1*, *FANCT/UBE2T*, *FANCU/XRCC2*, *FANCV/REV7*, a *FANCW/RFWD3* (Knies, Inano et al. 2017). Proteiny FA dráhy mají klíčovou úlohu při odstraňování ICL v DNA, které interferují s replikací DNA a transkripcí (Kottemann and Smogorzewska 2013, Rodriguez and D'Andrea 2017). FA geny jsou rozděleny do skupin dle jejich funkce v FA/BRCA reparační dráze na: upstream geny (*FANCA*, B, C, E, F, G, L, M, a T), ID komplex (*FANCD2* and I), a downstream geny (*FANCD1*, J, N, O, P, Q, R, S, U, V, a W). Proteinové produkty genů upstream skupiny formují jádro FA komplexu na chromatinu po nalezení ICL během S fáze, což vede k monoubikvitinilaci ID komplexu, který aktivuje skupinu proteinů downstream genů. Tato downstream skupina obsahuje endonukleázy, které štěpí vlákno DNA v místě překřížení za vzniku DNA aduktu a následně vzniká dvouřetězcový zlom, která může být opraven homologní rekombinací (Rodriguez and D'Andrea 2017). Mutace v genech FA jsou příčinou Fanconiho anemie, vzácného autozomálně recesivní onemocnění (s výjimkou X-vázané FA komplementační skupiny B (*FANCB*) a autozomálně dominantní FA komplementační skupiny R (*FANCR*)). Tento geneticky heterogenní syndrom patří mezi syndromy genomové instability, které se projevují skeletárními abnormalitami, orgánovými defekty, selháním kostní dřeně a predispozici k nádorovým onemocněním (Shimamura and Alter 2010, Rodriguez and D'Andrea 2017, Alter, Giri et al. 2018). Pacienti s diagnózou FA mají (dle jednotlivých komplementačních skupin) zvýšené až velmi vysoké riziko vzniku malignit již v nízkém věku (Shimamura and Alter 2010), nejčastěji akutní myeloidní leukémie, solidních tumorů hlavy a krku a pohlavních orgánů (Kee and D'Andrea 2012).

CÍL PRÁCE

Práce si kladla za cíl určit frekvenci výskytu patogenních mutací v nádorových predispozičních genech u pacientek s karcinomem ovaria v naší populaci, charakterizovat klinicko-patologické vlastnosti u pacientek s karcinomem ovaria, jež jsou nosičkami mutací v genech se známou/předpokládanou predispozicí ke vzniku karcinomu ovaria a identifikovat varianty v kandidátních genech, které by mohly být asociovány se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria.

METODY

Soubor testovaných osob

Celkem bylo panelovým sekvenováním (panel CZE CANCA - CZEch CAncer paNel for Clinical Application) vyšetřeno 1333 pacientek s diagnózou karcinomu ovaria. Do analýzy byly zahrnuty pacientky vyšetřované v laboratořích spolupracujících v rámci konsorcia CZE CANCA: A) laboratoř onkogenetiky, Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze (N=647); B) Oddělení epidemiologie a nádorové genetiky, Masarykův onkologický ústav, Brno (N=357); C) Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny GENNET, Praha (N=237); D) Oddělení lékařské genetiky, Laboratoře AGEL, Nový Jičín (N=34); E) Oddělení lékařské genetiky, GHC Genetics (N=12); F) Oddělení lékařské medicíny, Pronatal (N=1) a G) Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Olomouc (N=9).

Mezi pacientky byly zahrnuty ženy s karcinomem ovaria diagnostikovaným v letech 2010-2018. Od roku 2016 jsou ke genetickému testování indikovány všechny pacientky s karcinomem ovaria, bez ohledu na rodinnou nádorovou anamnézu či histologický typ nádoru (Foretová, Macháčková et al. 2016). Klinicko-patologická data byla shromážděna během genetické konzultace nebo získána ze zdravotní dokumentace pacientek. Pacientky s karcinomem ovaria a pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou byly rozděleny do skupin: i) s výskytem pouze karcinomu ovaria v rodině (HOC); ii) s výskytem karcinomu prsu a/nebo ovaria v rodině (HBOC); iii) s výskytem jiných nádorových onemocnění v rodině (multinádorové rodiny) a iv) bez výskytu nádorového onemocnění v rodině.

Studie analyzovala také 2278 populačně specifických kontrol, z nichž 616 bylo nenádorových kontrol pocházejících z center A (N=344); B (N=150) a C (N=122) a 1662 neselektovaných kontrol. Populace nenádorových kontrol byla reprezentována dobrovolníky (78 mužů a 538 žen) nad 60 let včetně, bez pozitivní osobní a rodinné nádorové anamnézy u příbuzných prvního stupně, kteří byli vyšetřeni panelovým sekvenováním (panelem CZE CANCA). Populace neselektovaných kontrol byla reprezentována 1170 muži a 492 ženami s mediánem věku 57 let (18-88 let), kteří byli analyzováni Národním centrem pro lékařskou genomiku (<http://ncmg.cz>) exomovým sekvenováním z jiných důvodů než nádorové onemocnění.

Pacientky a kontroly byly z kavkazské populace z České republiky. Všichni zúčastnění podepsali informovaný souhlas.

Sekvenování nové generace - NGS

Sekvenování nové generace je metoda masivního paralelního sekvenování s výtežností velkého množství DNA sekvencí v kratším čase. Využívá tvorbu specificky upravených fragmentů genomové DNA (tzv. sekvenační knihovny), výběr oblastí zájmu v rámci analyzovaného genomu (tzv. nabohacení či „enrichment“) a vlastní sekvenování na NGS platformě, při kterém dochází k zesílení signálu detekovaných bází pomocí klonální amplifikace a sekvenování syntézou s fluorescenčně značenými nukleotidy. Mezi léty 2005 a 2007 byly představeny první instrumenty NGS sekvenování a to firmami Roche/454 (Wheeler, Srinivasan et al. 2008), Illumina/Solexa (Bentley, Balasubramanian et al. 2008) a LifeTechnologies/ABI (McKernan, Peckham et al. 2009). Každá z těchto technologií využívá různé sekvenační chemie a přístupy pro amplifikaci vložené DNA, což má své výhody i nevýhody, které ovlivňují: délku čtení, kvalitu a výtežnost. Nicméně i přes tyto rozdíly sdílejí základní pracovní postup (Shendure and Ji 2008).

Příprava sekvenačního panelu

K sekvenování byl použit panel CZEKANCA, který byl navržen na našem pracovišti pomocí softwaru NimbleDesign (NimbleGen SeqCap EZ Choice, Roche). Tento panel specificky cílí na nádorové predispoziční geny se známou asociací ke vzniku nejčastějších dědičných nádorových syndromů (hereditárního karcinomu prsu, ovaria, kolorekta, pankreatu, žaludku, endometria, ledvin, prostaty a kůže) a další DNA reparační geny a geny s možnou asociací s nádorovým onemocněním identifikované v předcházející studii (Lhota, Zemankova et al. 2016). Oblast zájmu zahrnuje exony výše uvedených genů s přesahem 10pb do intronů a promotory vybraných genů (Soukupova, Zemankova et al. 2018) (Obrázek 3).

EZCapture (NimbleGen)

AIP; ALK; APC; APEX1; **ATM**; ATMIN; ATR; ATRIP; AURKA; AXIN1; BABAM1; BAP1; **BARD1**; BLM; BMPR1A; BRAP; **BRCA1**; **BRCA2**; BRCC3; BRE; **BRIP1**; BUB1B; C11orf30; C19orf40; casp8; CCND1; CDC73; **CDH1**; CDK4; CDKN1B; CDKN1C; CDKN2A; CEBPA; CEP57; CLSPN; CSNK1D; CSNK1E; CWF19L2; CYLD; DCLRE1C; DDB2; DHFR; DICER1; **DIS3L2**; **DMBT1**; DMC1; DNAJC21; DPYD; EGFR; EPCAM; EPHX1; ERCC1; ERCC2; ERCC3; ERCC4; ERCC5; ERCC6; ESR1; ESR2; EXO1; EXT1; EXT2; EYA2; EZH2; FAM175A; FAM175B; FAN1; FANCA; FANCB; FANCC; FANCD2; FANCE; FANCF; FANCG; FANCI; FANCL; **FANCM**; FBXW7; FH; FLCN; GADD45A; GATA2; GPC3; GRB7; HELQ; HNF1A; HOXB13; HRAS; HUS1; CHEK1; **CHEK2**; KAT5; KCNJ5; KIT; LIG1; LIG3; LIG4; LMO1; LRIG1; MAX; MCPH1; MDC1; MDM2; MDM4; MEN1; MET; MGMT; MLH1; MLH3; MMP8; MPL; **MRE11A**; MSH2; MSH3; MSH5; MSH6; MSR1; MUS81; MUTYH; NAT1; **NBN**; NCAM1; NELFB; **NF1**; NF2; NFKB1; NHEJ1; NSD1; OGG1; **PALB2**; PARP1; PCNA; PHB; PHOX2B; PIK3CG; PLA2G2A; PMS1; **PMS2**; POLB; POLD1; POLE; PPM1D; PREX2; PRF1; PRKAR1A; PRKDC; **PTEN**; PTCH1; PTTG2; RAD1; RAD17; RAD18; RAD23B; **RAD50**; RAD51; RAD51AP1; RAD51B; **RAD51C**; **RAD51D**; RAD52; RAD54B; RAD54L; RAD9A; RB1; RBBP8; RECQL; RECQL4; RECQL5; RET; RFC1; RFC2; RFC4; RHBDF2; RNF146; RNF168; RNF8; RPA1; RUNX1; **SBDS**; **SDHA**; SDHAF2; SDHB; **SDHC**; **SDHD**; SETBP1; SETX; SHPRH; SLX4; SMAD4; SMARCA4; SMARCB1; SMARCE1; **STK11**; SUFU; TCL1A; TLO2; TERF2; TERT; TLR2; TLR4; TMEM127; TOPBP1; **TP53**; TP53BP1; TSC1; TSC2; TSHR; UBE2A; UBE2B; UBE2I; UBE2V2; UBE4B; UIMC1; VHL; WRN; WT1; XPA; XPC; XRCC1; **XRCC2**; XRCC3; XRCC4; XRCC5; XRCC6; ZNF350; ZNF365.

Obrázek 3 – seznam 219 nádorově predispozičních genů, na které specificky cílí próby panelu CZECA.

XXXX – panel umožňuje čtení kompletního genu (všechny kódující exony +10 bp do intronu), XXXX –

panel umožňuje čtení kompletního genu (všechny kódující exony +10 bp do intronu) + 5'UTR oblasti, XXXX

– panel neumožňuje čtení kompletního genu, protože chybí některé exony z důvodu výskytu pseudogenů,

XXXX – próba pro tento gen v panelu chybí z důvodů pseudogenů, vysoce homologních míst, repetice apod.

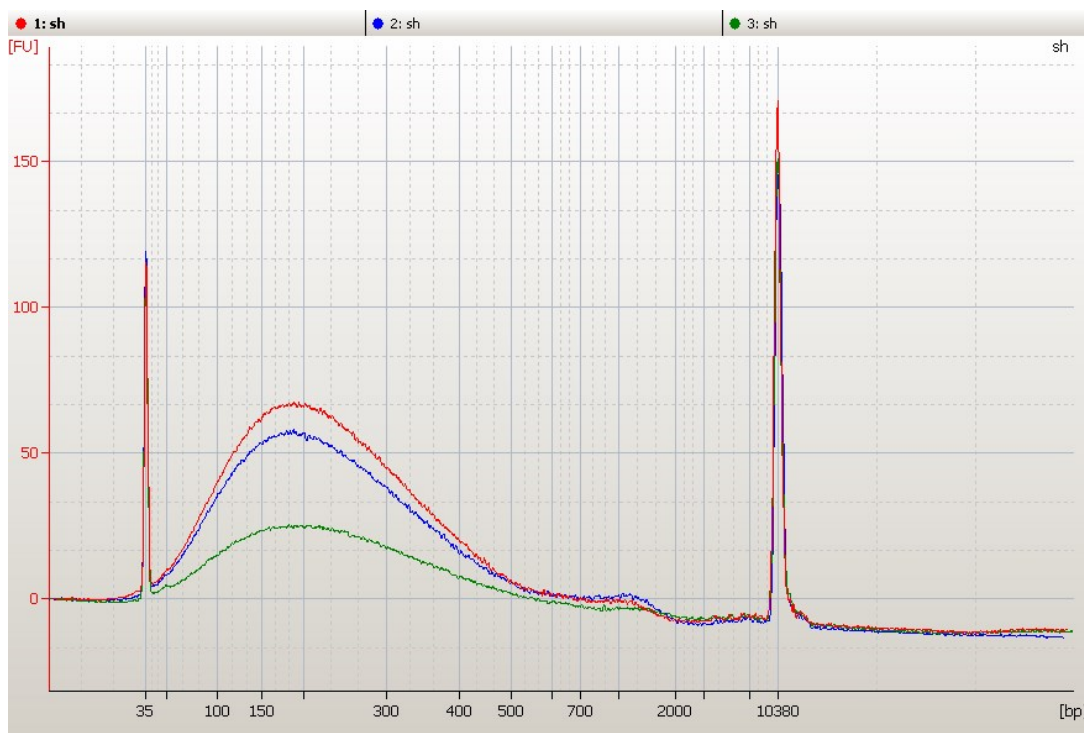
Příprava sekvenční knihovny

Přípravu vzorku lze rozdělit do několika základních fází. První fáze je náhodná fragmentace vložené DNA, následuje ligace adaptorů a vytvoření DNA knihovny, dále nabohacení sekvenční knihovny o vybrané oblasti genomu (enrichment) a nakonec amplifikace DNA knihovny.

Fragmentace DNA

Celý proces přípravy vzorku pro NGS začíná náhodnou fragmentací genomové DNA, v našem případě 500 ng DNA izolované z periferní krve a rozpuštěné v 53 µl TE (Tris-EDTA) pufru. Cílová velikost fragmentů byla 200 bp. Fragmentace preferenčně probíhala pomocí ultrazvukového štěpení na sonikátoru Covaris E220 (Covaris Inc) v nastavení optimalizovaném pro získání fragmentů o velikosti 200 bp. Jako alternativní způsob štěpení byla využita

enzymatická fragmentace s použitím fragmentázy (KAPA Biosystems, Roche) po dobu 25 minut při 37 °C. Velikost a kvalita fragmentů byla následně kontrolována pomocí Agilent High Sensitivity DNA kitu na bioanalyzeru Agilent 2100 (Agilent) u třech náhodně vybraných vzorků zpracovávaných paralelně (Obrázek 4).



Obrázek 4 - výstup z bioanalyzeru 2100 (Agilent) pro kontrolu kvality a velikosti fragmentů DNA po fragmentaci u třech náhodně vybraných vzorků.

Úprava fragmentů DNA

Pro celý proces přípravy sekvenční knihovny byl využíván KAPA HTP Library Preparation kit (pro DNA fragmentovanou pomocí ultrazvuku) nebo KAPA HyperPlus Kit (pro vzorky fragmentované enzymaticky) (obojí KAPA Biosystems, Roche). Příprava knihovny probíhala dle modifikovaného protokolu výrobce.

Prvním krokem přípravy knihovny je tzv. DNA end-repair, který vede k vytvoření tupých konců na každém dvouřetězci fragmentu DNA. Díky 3' > 5' exonukleázové aktivitě KAPA HiFi HotStart DNA polymerázy jsou odstraněny 3' přesahy a k 5' konci je připojena fosfátová skupina. V dalším kroku, A- tailingu, dochází k připojení dAMP na 3' konce upravených DNA fragmentů a poté následuje připojení dvouřetězcových adaptorů (Obrázek 5) s přesahem dTNP na 3' konci. Mezi každým krokem (End repair, A tailing a ligace adaptorů) byl vzorek

purifikován pomocí SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) magnetických kuliček AMPure XP (Beckmann Coulter).

i5_adapter_1

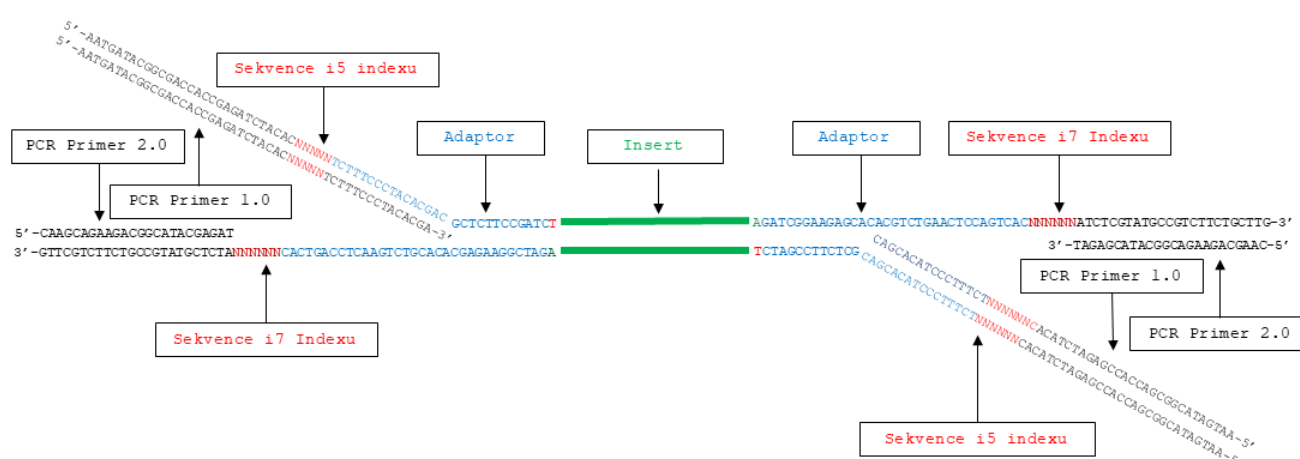
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T

i7_adapter_2

pGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC

**fosfotiolátová vazba pro stabilitu jednonukleotidového T přesahu.*

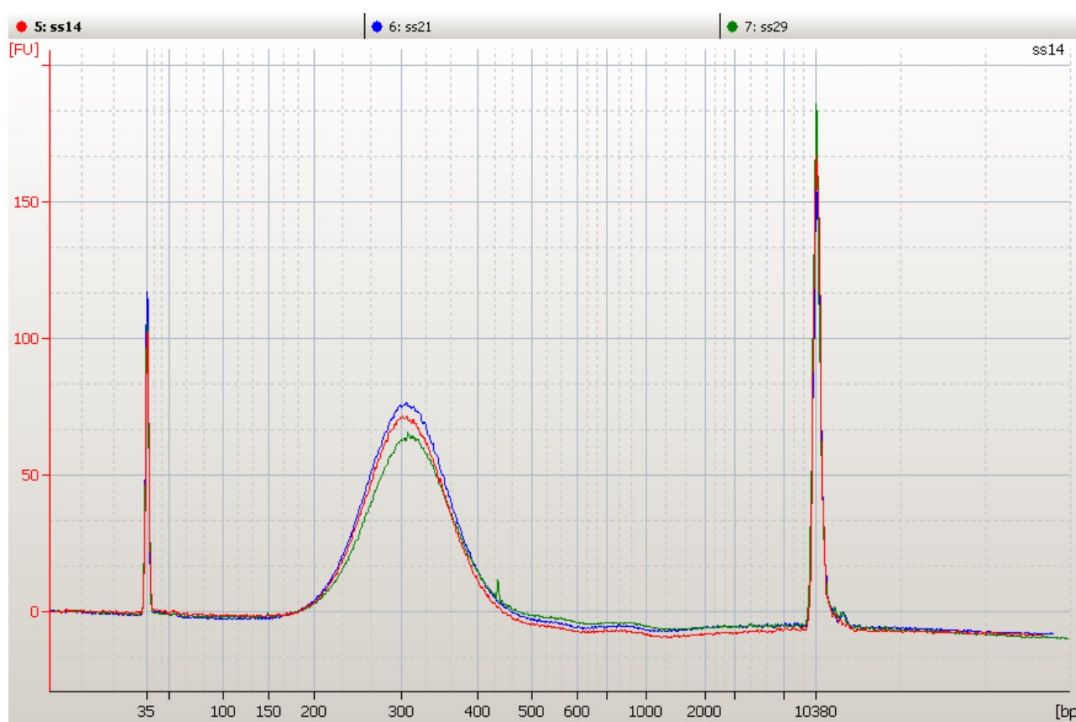
Příprava dvouřetězcových adaptorů (in-house, syntéza Generi Biotech) probíhala v Tris:NaCl pufru (50 mM Tris:HCl pH 7.5; 50 mM NaCl) při 97°C/2 min, 72×(97°C/1 min (-1°C per cyklus)), 25°C/ 5min (Obrázek 5).



Obrázek 5 - schematické znázornění jednoho fragmentu DNA z finální sekvenační knihovny s příslušnými sekvencemi připojenými v jednotlivých krocích přípravy knihovny. Fragment genomové DNA (Insert – zeleně) je adenylací opatřen jednořetězcovými jednonukleotidovými přesahy na 3' koncích. Na insert je ligována částečně dvouřetězcová molekula adaptoru (struktura vidličky) (modře, jednobázový T přesah červeně). V první PCR (polymerase chain reaction), která probíhá před hybridizačním nabohacením knihovny, jsou pomocí primerů částečně komplementárních k adaptorům (PCR Primer 1.0) vneseny do molekul knihovny sekvence indexů umožňující multiplexaci vzorků pro enrichment, tj. simultánní hybridizaci vzorků od více pacientů v jedné reakci. Indexy se nachází na obou stranách (i5 a i7) jednotlivých fragmentů DNA a jejich kombinací je možné rozlišit jednotlivé vzorky sekvenování v jednom sekvenačním běhu. Vyznačeny jsou i sekvence primerů využívaných v amplifikaci finální nabohacené knihovny (PCR Primer 2.0), které nasedají na koncové části molekuly knihovny. Tyto části jsou zároveň komplementární k oligonukleotidům imobilizovaným na sekvenační flow-cell v systému MiSeq.

Size selekce

Při přípravě knihovny jsme používali dvoukrokovou “double-size selekci“, kdy byly v prvním kroku odstraněny fragmenty delší než 450 bp a v druhém kroku kratší než 250 bp. Technika selekce ideálně dlouhých fragmentů využívá magnetických kuliček (AMPure XP beads) a polyethylenglykolu (PEG). Koncentrace PEG určuje délku DNA fragmentů vázajících se na magnetické kuličky. Distribuci fragmentů dle velikosti jsme kontrolovali kapilární elektroforézou na Bioanalyzer 2100 pomocí kitu DNA High Sensitivity (Agilent Technologies). Medián velikosti fragmentů je 300 bp (Obrázek 6).



Obrázek 6 - výstup z bioanalyzeru 2100 (Agilent) pro kontrolu kvality a velikosti fragmentů DNA u třech vzorků po kroku size selekce.

Ligation-Mediated polymerase chain reaction (LM-PCR)

Fragmenty DNA s upravenými konci po size-selekci byly amplifikovány pomocí LM-PCR s použitím primerů, jejichž část sekvence je komplementární k sekvenci adaptorů a část sekvence nese tzv. barcode neboli index. Během LM-PCR dojde tedy k amplifikaci a indexaci všech velikostně vyselektovaných fragmentů DNA s připojeným adaptorem. Indexy slouží k identifikaci vzorků, které jsou sekvenovány společně.

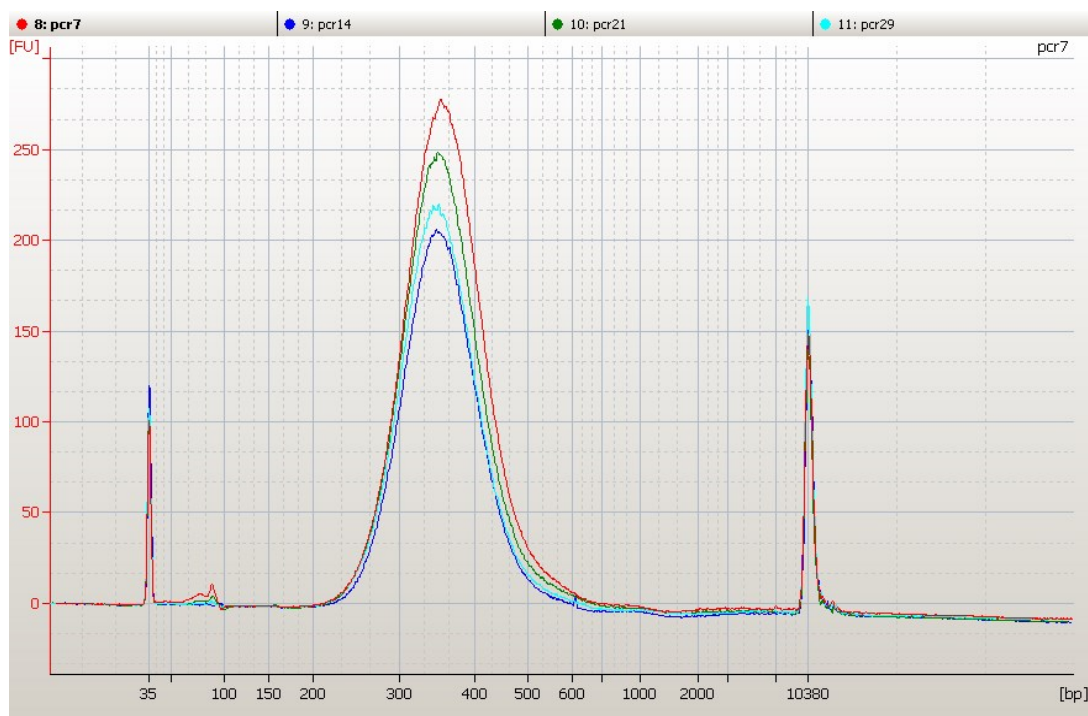
Primer 1:

5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACxxxxxxxxxACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T-3'

Primer 2:

5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATxxxxxxxxxGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*C-3'

Kde “*” značí fosfotiolátovou vazbu a “xxxxxxxxx” značí sekvenci konkrétních indexů, stejných jako Illumina Truseq HT index i7 and i5. LM-PCR probíhala za následujících podmínek: 98°C/45s, 6×(98°C/15s, 65°C/30s, 72°C/30s), 72°C/5min. Snížení cyklů LM-PCR vedlo k redukci PCR duplikátů v sekvenačních datech. Po LM-PCR byl vzorek purifikován pomocí magnetických kuliček AMPure XP (Beckmann Coulter). Kontrola distribuce délek fragmentů byla ověřena na kapilární elektroforéze Bioanalyzer 2100 s kitem DNA High Sensitivity (Agilent Technologies, Obrázek 7). Medián velikosti fragmentů byl 350 bp. Koncentrace jednotlivých vzorků byla stanovena pomocí Qubit kit a pohybovala se okolo 17 ng/μl (Obrázek 7).



Obrázek 7 - výstup z bioanalyzeru 2100 (Agilent) pro kontrolu kvality a velikosti fragmentů DNA u třech vzorků po LM-PCR reakce.

Nabohacení cílových oblastí (Enrichment)

V dalším kroku dochází k nabohacení cílené DNA (tzv. DNA enrichment či sequence capture). K dosažení cílového pokrytí 100x na systému MiSeq, sekvenační chemie MiSeq Reagent Kit v3 (150-cycle) (Illumina) bylo v ekvimolárním množství smícháno 30 vzorků označených barcodey do celkového množství 1 µg. Ke vzorkům byla přidána Cot-1 DNA, která omezuje nespecifickou hybridizaci a tzv. barblocks v celkovém množství 2,000 pmol. Jedná se o oligonukleotidy, které nasedají na koncové části DNA fragmentů knihovny včetně sekvence indexů na základě komplementarity k části sekvence vnesené indexovacími primery. Reakční směs byla vysušena ve vakuovém rotačním koncentrátoru SpeedVac (Eppendorf), následně byla DNA rozpuštěna v hybridizačních pufrech (SeqCap Hybridization and Wash Kits, Roche), zdenaturována při teplotě 95°C po dobu 10 min, přidána k sekvenačnímu panelu a inkubována 16-72 hodin při 47 °C. K nabohacení cílových úseku DNA byl použit sekvenační panel CZEKANCA. Po hybridizaci jsou k fragmentům s cílovými sekvencemi navázanými na biotinylované próby přidány magnetické kuličky se streptavidinem (M-270 Streptavidin Dynabeads, Thermo Fisher Scientific). Pomocí vysoce specifické vazby biotin-streptavidin jsou na magnetických kuličkách vychytány pouze fragmenty knihovny, ke kterým se nahybridizovaly cílené próby, tj. knihovna je nabohacena o oblasti zájmu.

Amplifikace DNA knihovny

Po nabohacení a přečištění byly cílové fragmenty amplifikovány při 98°C/45s, 11×(98°C/15s, 60°C/40s, 72°C/30s), 72°C/1 min s použitím primerů komplementárních k části sekvence vnesené indexovacími primery (Obrázek 5).

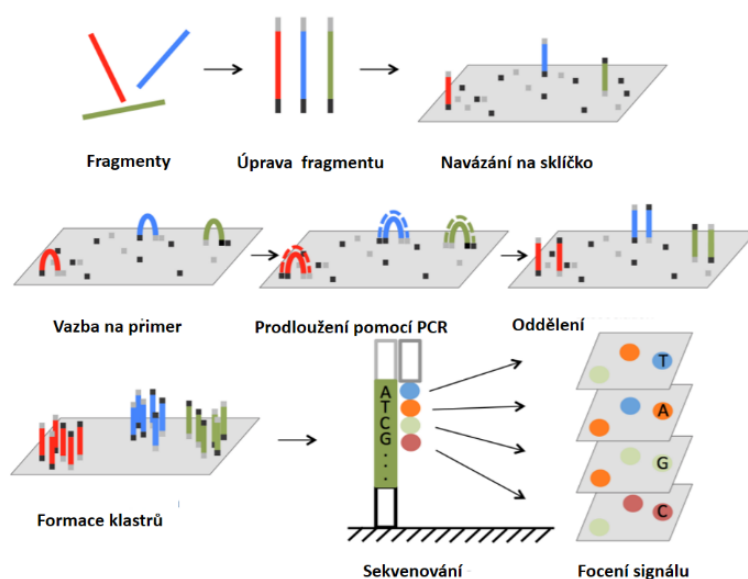
Primer 1: 5' -AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACAC-3'

Primer 2: 5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-3'

Výsledná knihovna byla purifikována pomocí magnetických kuliček AMPure XP (Beckmann Coulter). Koncentrace knihovny byla stanovena pomocí Qubit kit, a pohybovala se okolo 2,5 ng/µl. Míra nabohacení knihovny o cílové oblasti byla kontrolována pomocí qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Jedná se o kvantitativní stanovení oblastí vychytávaných prostřednictvím kontrolních prób, jež byly součástí sekvenačního panelu. Výsledná knihovna v množství 18 pM byla denaturována NaOH a sekvenována na systému Miseq s použitím MiSeq Reagent Kit v3, 150 cycles (Illumina).

Sekvenování knihovny

V naší práci jsme k sekvenování využívali platformu Miseq (Illumina), která využívá syntézu reverzního vlákna s reverzibilně terminačními nukleotidy a s navázanou fluorescenční značkou. Na začátku sekvenování je proces zvaný můstková amplifikace. Amplifikace probíhá na pevném povrchu – sklíčku, které je hustě pokryto oligonukleotidy sloužícími jako primery (forward i reverse primery). Knihovna, která je rozpuštěná, zdenaturovaná a jednořetězcová DNA, se náhodně váže na povrch sklíčka k oligonukleotidům, jež jsou komplementární k sekvencím vneseným na konce fragmentů analyzovaných DNA v průběhu přípravy knihovny. Dochází k dosyntetizování komplementárního řetězce - syntéza je zahájena z oligonukleotidů vázaných na sklíčko a původní vlákno je odmyto. V dalším kroku je DNA znovu denaturována za vzniku jednořetězcové DNA, která se přes koncové sekvence naváže na komplementární oligonukleotidy na sklíčku za tvorby „můstku“. Polymeráza dosyntetizuje komplementární řetězec a následně je dvouřetězec DNA denaturován. Celý cyklus se opakuje a výsledkem je tvorba klastrů DNA na sklíčku. Každý klastr tedy vznikl amplifikací jednoho původního fragmentu DNA ze sekvenované knihovny. Poslední krok před samotným sekvenováním je denaturace a vytvoření jednořetězcových DNA molekul v rámci klastrů (Adessi, Matton et al. 2000, Fedurco, Romieu et al. 2006). Během sekvenačního cyklu jsou přidávány fluorescenčně značené nukleotidy (každý nukleotid má svou značku), primery a DNA polymeráza. V každém sekvenačním cyklu je detekována jedna báze. Po syntéze je kamerou zachycena laserem indukovaná fluorescence, identifikován nukleotid v každém klastru prostřednictvím vysoce citlivé kamery (Obrázek 8). Následně jsou reverzibilní fluorescenční terminátory odštěpeny a začíná nový sekvenační cyklus, tzv. sekvenování syntézou. Fluorofor spolu s chemickou modifikací zabráňující elongaci je poté odštěpen ze sekvence a klastr je znovu připraven na další cyklus elongace. Pořadí všech snímků pro daný klastr je poté konvertováno do sekvence bází daného fragmentu sekvenační knihovny. Takových sekvencí („readů“) je na flow-cell v průběhu sekvenace vytvořeno kolem 50 milionů a následnou bioinformatickou analýzou jsou mapovány na referenční sekvenci genomu (Bentley, Balasubramanian et al. 2008, Metzker 2010).



převzato a upraveno z Lu et al. 2016(Yuan Lu 2016)

Obrázek 8 – schéma můstkové amplifikace na sklíčku. Adaptory jsou naligovány na konce fragmentů. Fragmenty se přes adaptory naváží na primery na sklíčku a pomocí můstkové amplifikace se z jednotlivých fragmentů vytvoří klastry. Během každého sekvenačního cyklu se jeden fluorofor naváže na poslední nukleotid na prodlužujícím se vlákne. Laser poté excituje fluorofory na všech fragmentech a optický scanner vyfotí signál z každého shluku. Poté je sekvenační terminátor odstraněn a sekvenační cyklus začíná znovu.

Bioinformatická analýza

Detekce jednonukleotidových variant - SNVs (single nucleotide variants) a malých insercí a delecí (INDELS) z hrubých dat může být rozdělena na 3 části: 1. Alignment- mapování na referenční genom, 2. Variant calling (genotypování) – identifikování oblastí, které vykazují odlišnost oproti referenčnímu genomu, 3. Filtrace variant a anotace – filtrace vybraných odlišností/variant na základě kvality sekvenování a přiřazení biologické funkce dané variantě.

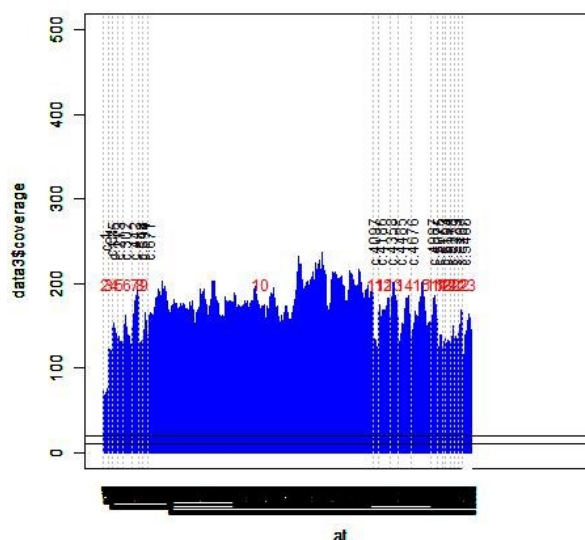
Výsledkem sekvenování na platformě Illumina je text ve formě FASTQ formátu obsahující miliony krátkých čtení společně s hodnotou kvality každé báze. Kvalita byla kontrolována pomocí FastQC v0.11.2. FASTQ soubory byly mapovány na referenční genom pomocí Novoalign v2.08.03 na genom hg19 za vytvoření SAM formátu, který byl pomocí Picard tools v1.129 softwaru transformován na binární formu - BAM formát. V tomto kroku byly odstraněny PCR duplikáty namapovaných readů, tedy sekvence molekul pocházející ze stejného původního fragmentu DNA. Kvalita namapovaných bází byla kontrolována pomocí nástroje Genome Analysis Toolkit (GATK) v3.3. Finální BAM soubor byl konvertován pomocí

GATK pipeline do VCF formátu (variant-call format). K nalezeným variantám byly přidány informace z externích databází (např. ExAC, 1000Genome, ClinVar), hodnoty vybraných *in silico* predikčních algoritmů usnadňujících hodnocení biologického významu nalezených variant (např. SIFT, Mutation Analyzer, MutationTaster, LRT, polyPhen-2, phyloP, GERP, CADD nebo spidex). Finální BAM data jednotlivých vzorků slouží také k vizualizaci sekvenačních dat pomocí IGV (Integrative Genomics Viewer).

Středně dlouhé inserce a tandemové duplikace (přesahující přibližně polovinu sekvenačního čtení) byly hodnoceny pomocí nástroje Pindel s využitím hodnocení soft-klipových bází. Vstupem pro analýzu byl BAM.

Pro analýzu velkých genomových přestaveb (copy number variation; CNV) byl využit upravený nástroj CNVkit, který vychází z pokrytí daného úseku. Hodnoty CNV skóre byly normalizovány. Vstupem pro analýzu byl BAM.

Pokrytí vybraných cílových oblastí bylo vizualizováno pomocí *in-house* nástroje pro každý vzorek (R, Petra Zemánková). Hranice minimálního pokrytí pro spolehlivou identifikaci SNV byla 20X. Vstupem pro analýzu byl BAM (Obrázek 9).



Obrázek 9 - vizualizace pokrytí cílových oblastí genu *BRCA1*

Klasifikace variant

Nejprve jsme analyzovali 18 genů klinicky relevantních k HBOC syndromu dle NCCN a to: *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*. Nalezené varianty s frekvencí $\leq 0,01$ v projektu 1000 Genomes a $\leq 0,05$ v nenádorových kontrolách byly rozděleny do 3 skupin: 1) patogenní / pravděpodobně patogenní varianty, 2) varianty nejasného významu (Variants of unknown/uncertain significance; VUS) a 3) benigní / pravděpodobně benigní varianty. Klasifikace vycházela z doporučení ENIGMA konsorcia (<https://enigmaconsortium.org>). Všechny nonsense, posunové a sestřihové ($\pm 1-2$ bp) mutace spolu s rozsáhlými delecemi či insercemi byly považovány za patogenní/pravděpodobně patogenní, pokud nebyly klasifikovány jinak dle ClinVar databáze. Duplikace celého genu byly považovány za varianty nejasného významu. Ostatní typy mutací byly považovány za patogenní či pravděpodobně patogenní, pokud tak byly hodnoceny alespoň dvěma pracovišti v databázi ClinVar. Varianty nejasného významu v genu *TP53* byly hodnoceny dle databáze IARC TP53 (<http://p53.iarc.fr/>). Hodnocení variant nejasného významu v genu *CHEK2* vycházelo z funkční analýzy (Kleiblova, Stolarova et al. 2019).

Následně jsme hodnotili varianty v dalších 201 genech analyzovaných panelem CZEKANCA. Nonsense, posunové a sestřihové ($\pm 1-2$ bp) mutace spolu se CNV (mimo duplikací celého genu) s frekvencí $\leq 0,01$ v projektu 1000 Genomes a $\leq 0,05$ v nenádorových kontrolách byly hodnoceny jako patogenní.

Všechny patogenní/pravděpodobně patogenní varianty byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním a CNV pomocí MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) nebo qPCR, pokud nebyla MLPA k dispozici.

Sangerovo sekvenování

Před vlastním Sangerovým sekvenováním byla provedena amplifikace příslušných úseků DNA pomocí PCR reakce s využitím FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) za jednotných amplifikačních podmínek a to: 5 minutovou denaturaci při 95°C, následovanou 40 cykly při 95°C/30 s, 60°C/30s, 72 °C/1 min/cyklus a závěrečnou elongaci 7 minut při 72 °C. Primery pro confirmaci nalezených variant byly navrženy pomocí webové aplikace Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Po ověření přítomnosti a kvality PCR produktu pomocí gelové elektroforézy byl vzorek purifikován pomocí ExoSAP-IT

(Affymetrix). Jedná se o směs exonukleázy a alkalické fosfatázy vedoucí k odstranění primerů a nukleotidů nevyužitých během PCR. Přečištěné PCR produkty byly substrátem pro sekvenační reakci s použitím BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) obsahující fluorescenčně značené dideoxynukleotidy. Výsledný produkt sekvenační reakce byl přečištěn acetát/etanolovou precipitací. Vzorek byl po denaturaci ve formamidu analyzován na automatickém sekvenátoru ABI3130 (Applied Biosystems). K vizualizaci elektroforeogramů byl použit program FinchTV 1.3.1 (Geospiza, Inc.).

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Metoda MLPA slouží k detekci CNV (MRC Holland). Metoda je založena na současné amplifikaci více sond, které specificky cílí na analyzované a kontrolní oblasti. Protože každá sonda je tvořena ze dvou částí, je podmínkou úspěšné amplifikace hybridizace obou částí sond k cílové oblasti spolu s jejich ligací. Amplifikace všech zligovaných sond probíhá univerzálním párem fluorescenčně značených primerů, které jsou komplementární ke koncovým oblastem sond. Délka jednotlivých sond se liší díky zařazení různě dlouhých sekvencí do jednotlivých sond (Obrázek 10). Odlišná délka amplifikovaných značených sond umožňuje jejich separaci kapilární elektroforézou. Data jsou analyzována pomocí Coffalyzeru (MRC Holland). Relativní snížení signálu určité sondy (velikosti plochy pod píkem) vzhledem k signálu kontrolních sond na polovinu ukazuje na delecii analyzované oblasti na jedné alele, zvýšení pak na duplikaci.



Obrázek 10 - schématické znázornění MPLA. Zdroj oficiální protokol MLPA (MRC Holland)(Holland 2019).

Statistická analýza

OR bylo pro vybrané geny spočítáno pomocí Fisherova statistického testu a za signifikantní byla považována hodnota $p < 0,05$. Pacientky, u kterých byly nalezeny dvě a více patogenních mutací byly vyřazeny z analýzy OR. Pro identifikaci dalších potenciálních genů, které by mohly být asociovány s rizikem vzniku karcinomu ovaria, byla použita Bonferroniho korekce. Asociace mutace s klinicko-patologickou charakteristikou byla testována pomocí Fisherova testu a p hodnoty menší než 0,05 byl považovány na signifikantní.

VÝSLEDKY

Charakterizace pacientek s karcinomem ovaria

Do studie bylo zahrnuto 1333 pacientek s karcinomem ovaria, které byly sekvenovány v sedmi centrech s využitím stejného panelu. Sekvenační data byla hodnocena na našem pracovišti stejnou bioinformatickou pipeline. Skupina pacientek zahrnovala 1045 (78,4%) pacientek pouze s karcinomem ovaria a 288 pacientek s nádorovou duplicitou, z nichž u 210 byl diagnostikován karcinomu prsu a ovaria (15,8%) a u 78 karcinom ovaria a jiný tumor (5,9%). Průměrný věk v době diagnózy byl 53,7 let (15-86 let) a téměř polovina (47,6%) pacientek měla negativní rodinnou nádorovou anamnézu. U 65% (728/1120) pacientek s dostupnou informací o histologickém typu nádoru byl identifikován serózní adenokarcinom, nejčastěji HG serózní. Téměř u dvou třetin pacientek byl nádor identifikován v pokročilém stádiu (III/IV). Detailní klinicko-histopatologické charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 7.

Kategorie	N	% známých
<i>Věk v době diagnózy (roky)</i>		
<30	84	6.46
30-39	152	11.69
40-49	282	21.69
50-59	360	27.69
60-69	328	25.23
>70	94	7.23
n.a.	33	
<i>Osobní historie</i>		
pouze OC	1045	78.39
OC & BC	210	15.75
OC & jiné nádory	78	5.85
<i>Rodinná historie</i>		
HOC	119	9.64
HBOC	345	27.96
MCF	182	14.75
Žádné	588	47.65
n.a.	99	
<i>Histologie</i>		
HG serózní	478	42.68
LG serózní	85	7.59
Serózní nespecifický	165	14.73
Endometroidní	90	8.04
Mucinózní	43	3.84
Světlobuněčný	15	1.34
Jiná	90	8.04
Borderline	154	13.75
n.a.	213	

<i>Stádium v době diagnózy(FIGO)</i>		
I	302	31.46
II	86	8.96
III	472	49.17
IV	100	10.42
n.a.	373	

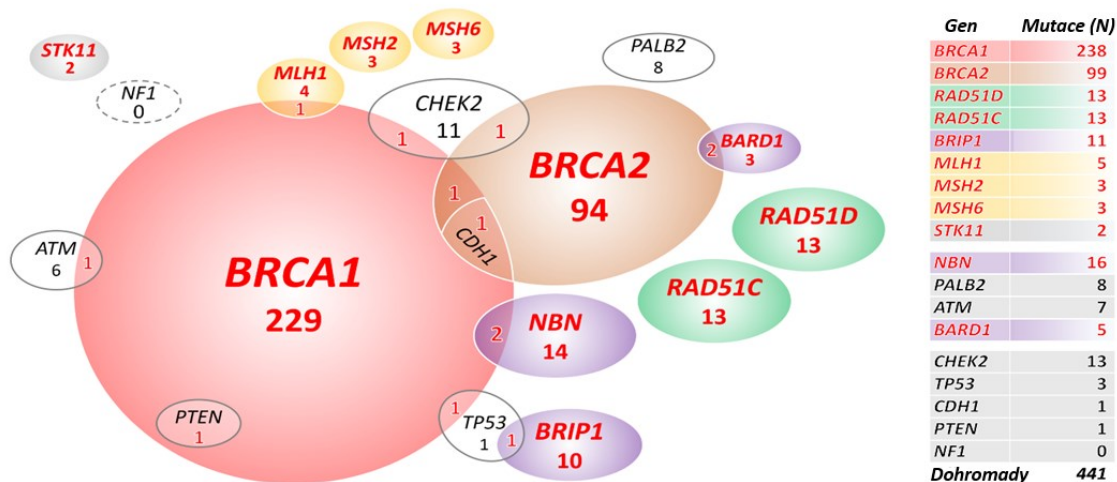
Tabulka 7 - klinicko-patologické charakteristiky 1333 pacientek s karcinomem ovaria. **Vysvětlivky:** **OC**- ovarian cancer/karcinom ovaria, **BC** - breast cancer/karcinom prsu, **HOC** - hereditary ovarian cancer/hereditární karcinom ovaria, **MCF** - multicancer family/rodina s výskytem různých typů nádorového onemocnění.

Mutace v 18 genech predisponujících k syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria

V této studii jsme v první fázi hodnotili 18 genů predisponujících k dědičnému karcinomu prsu a ovaria dle NCCN (Guidelines for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian and Pancreatic (Version 1.2020;4 December 2019), u nichž je známá či předpokládaná asociace se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria. U 427 (32%) pacientek s karcinomem ovaria jsme identifikovali 441 patogenních mutací v 18 genech se známou či předpokládanou predispozicí ke karcinomu prsu a ovaria. Mezi těmito pacientkami bylo 13 nosiček dvou nebo tří patogenních mutací, tyto pacientky byly vyřazeny s dalších analýz (Tabulka 8). V souboru 2278 populačně-specifických kontrol jsme v uvedených 18 genech našli mutace u 58 jedinců (2,5%) (Obrázek 11).

Mut. 1	Mut. 2	Mut. 3	OC (věk v době dg)	BC (věk v době dg)	Další nádory (věk v době dg)	RA	OC Histologie
<i>BRCA1</i>	<i>ATM</i>	-	46,7	49,8	melanom (46)	HOC	HG serózní
<i>BRCA1</i>	<i>CHEK2</i>	-	65,0	65,0	-	0	HG serózní
<i>BRCA1</i>	<i>NBN</i>	-	52,1	-	-	MCF	HG serózní
<i>BRCA1</i>	<i>PTEN</i>	-	34	-	-	HBOC	HG serózní
<i>BRCA2</i>	<i>BARD1</i>	-	58,6	-	-	HOC	HG serózní
<i>BRCA2</i>	<i>BARD1</i>	-	53,0	-	-	HBOC	HG serózní
<i>BRCA1</i>	<i>TP53</i>	-	40,8	-	-	HBOC	HG serózní
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	-	48,7	46,5	-	HBOC	jiná
<i>BRIP1</i>	<i>TP53</i>	-	30,0	44,0	-	MCF	jiná
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CDH1</i>	56,0	n.a.	-	HBOC	n.a.
<i>BRCA1</i>	<i>MLH1</i>	-	42,3	38,3	endometria (58)	HBOC	n.a.
<i>BRCA1</i>	<i>NBN</i>	-	46,0	-	-	HOC	n.a.
<i>BRCA2</i>	<i>CHEK2</i>	-	61,7	66,4	-	0	n.a.

Tabulka 8 - klinická a patologická charakteristika vícenásobných nosiček mutací. **Vysvětlivky:** **n.a.** not available; **HOC**-hereditary ovarian cancer/dědičný karcinom ovaria; **HBOC**- hereditary breast and ovarian cancer/dědičný karcinom prsu a ovaria; **MCF**-Multiple cancer families/rodiny s vícečetným výskytem nádorového onemocnění; **OC**-ovarian cancer/karcinom ovaria; **BC**- breast cancer/karcinom prsu; **RA** – rodinná anamnéza; **HG** -high grade; **LG** - low grade



Obrázek 11 - u 427 nosiček bylo nalezeno 441 mutací v 18 známých či očekávaných predispozičních genech asociovaných s karcinomem prsu a ovaria. Dohromady u 399 nosiček byla nalezena mutace v některém z 10 genů signifikantně asociovaných se vznikem karcinomu ovaria, zde znázorněny červeně. Gen *STK11* je zahrnut mezi ováriální predispoziční geny, protože se jedná o vzácně mutovaný gen s prokázanou asociací se vznikem karcinomu ovaria.

Signifikantně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria jsme v naší práci našli u nosiček zárodečných mutací v 10 genech (Tabulka 9).

Nejčastěji mutovanými geny u pacientek byly hlavní predispoziční geny *BRCA1* a *BRCA2* (323/1320; 24,5% pacientek). U populačně-specifických kontrol jsme našli mutace v *BRCA1/2* u 12/2278 jedinců (0,5%). Více než třetinu všech mutací v *BRCA1/2* (114/323; 35,9%) u pacientek představovaly tři zakladatelské („founder“) mutace v *BRCA1* c.5266dupC, c.3700_3704delGTAAA a c.181 T > G.

U 65/1320 (4,9%) pacientek s karcinomem ovaria a 19/2278 kontrol (0,8%) byla nalezena mutace v jednom z dalších 8 genů signifikantně asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria (včetně genu *STK11*, který v naší studii nedosáhl hranice statistické významnosti kvůli velmi nízké frekvenci mutací, avšak patří mezi geny s potvrzeným vysokým rizikem vzniku karcinomu ovaria).

Velké genomové přestavby představovaly 8,4% (37/441) ze všech patogenních mutací a byly nalezeny v sedmi genech: *BRCA1* (23×), *BRIP1* (4×), *CHEK2* (4×), *MLH1* (2×), *STK11* (2×), *PALB2* (1×) a *CDH1* (1×) u 37/1333 (2,8%) pacientek. U kontrolní skupiny jsme při CNV

analýze 18 uvedených genů našli pouze jednu duplikaci postihující celý gen *MSH6*, kterou jsme klasifikovali jako variantu nejasného významu.

Gen	1,320 OC patientek ^{a, c)} N mutací (%)	2,278 PSK N mutací (%)	OR (95% CI); p ^{a)}
<i>Zvýšené riziko OC ^{b)}</i>			
<i>BRCA1</i> ^{c)}	229 (17,35)	5 (0,22)	95,2 (40,1 - 295,2); 1,83×10⁻⁹⁷
<i>BRCA2</i> ^{c)}	94 (7,12)	7 (0,31)	24,9 (11,6 - 63,6); 1,16×10⁻³³
<i>RAD51D</i>	13 (0,98)	2 (0,09)	11,3 (2,6 - 103,4); 9,66×10⁻⁵
<i>RAD51C</i>	13 (0,98)	4 (0,18)	5,7 (1,7 - 23,8); 0,001
<i>BRIP1</i> ^{c)}	10 (0,76)	5 (0,22)	3,5 (1,1 - 13); 0,03
<i>MLH1</i> ^{c)}	4 (0,3)	1 (0,04)	6,9 (0,7 - 340,4); 0,06 ^{d)}
<i>MSH2</i>	3 (0,23)	0	- ; 0,049 ^{d)}
<i>MSH6</i>	3 (0,23)	0	- ; 0,049 ^{d)}
<i>STK11</i>	2 (0,15)	0	- ; 0,13
<i>Potencionálně zvýšené riziko OC nebo neprokazatelné riziko OC ^{b)}</i>			
<i>NBN</i> ^{c)}	14 (1,06)	7 (0,31)	3,5 (1,3 - 10,2); 0,006
<i>PALB2</i>	8 (0,61)	9 (0,40)	1,5 (0,5 - 4,5); 0,45
<i>ATM</i> ^{c)}	6 (0,45)	8 (0,35)	1,3 (0,4 - 4,3); 0,78
<i>BARD1</i> ^{c)}	3 (0,23)	0	- ; 0,049
<i>Nezvyšující riziko OC ^{b)}</i>			
<i>CHEK2</i> ^{c)}	11 (0,83)	8 (0,35)	2,4 (0,9 - 6,8); 0,06
<i>TP53</i> ^{c)}	1 (0,08)	2 (0,09)	0,9 (0 - 16,6); 1
<i>CDH1</i> ^{c)}	0	0	-
<i>PTEN</i> ^{c)}	0	0	-
<i>NFI</i>	0	0	-

Tabulka 9 - frekvence mutací u 1 320 pacientek s karcinomem ovaria a 2 278 populačně specifických kontrol (PSK).

^{a)} Prevalence mutací u všech 1 333 pacientů (včetně 13 nosičů více mutací) je uvedena v (Lhotova, Stolarova et al. 2020)

^{b)} Klasifikace genů dle NCCN guidelines verze 2020.1.

^{c)} Vyřazení 13 násobných nosiček popsaných v obrázku 11 and tabulce 8.

^{d)} Analýza všech genů Lynchova syndromu: OR=22,63 (95%CI 3,4 – 958,5); p=1,95×10⁻⁰⁵.

	BRCA1	BRCA2	RAD51C	RAD51D	BRIP1	MLH1	MSH2	MSH6	STK11	NBN	PALB2	ATM	BARD1	CHEK2	TP53	CDH1	PTEN	NF1	<i>Pac. s mutací</i>	<i>Pac. bez mutace</i>	<i>Všechny pacientky bez násobných nosiček</i>
Věk v době diagnózy (roky)																					
<30	2	1	2						1	1		1	1	4					13	71	84
30-39	20	1		1	0	1	2	1		1				1	0		0		28	122	150
40-49	79	12	4	3	2	1	1			2	2	1			0				107	171	278
50-59	84	38	5	5	4	1		1		6	1		1	3		0			149	207	356
60-69	32	33	2	4	3	1				3	3	3		2					86	240	326
>70	9	8			1			1	1	1	2	1	1	1	1				27	67	94
n.a.	3	1																	4	28	32
Osobní nádorová historie																					
OC & BC	73	28	2	1						4	4	1	1	2					116	87	203
pouze OC	149	60	10	12	10	1	2	2	2	9	4	5	1	9	1				277	761	1038
OC & non-BC	7	6	1			3	1	1		1			1						21	58	79
Rodinná nádorová historie																					
HOC	42	11	1				1	1					1	3					60	56	116
HBOC	90	37	5	1	2		2			1	1	1	1	2	1				144	195	339
MCF	33	14		1		1		1		3	2	2		2					59	121	180
žádná	57	28	5	10	7	3			1	9	5	3	1	4					133	454	587
n.a.	7	4	2	1	1			1	1	1									18	80	98
Stádium v době diagnózy																					
I	26	12	1	1	1	3	1	2		7		1		3					58	241	299
II	20	2		2		1				2				2					29	57	86
III	109	39	6	8	4		1				3	1	2	4					177	289	466
IV	21	4	4		2					2	2	1			1				37	63	100
n.a.	53	37	2	2	3		1	1	2	3	3	3	1	2					113	256	369
Histologie																					
HG serózní	101	45	5	7	2	2	2			3	5	2	1	3					178	294	472
Serózní nespecifikovaný	39	13	1	3	2					1			1	1					61	104	165
Borderline	34	10	1	1	2					1		2			1				52	100	152
Endometroidní	16	2	2	1	1	2				2				4					30	60	90
Mucinózní	3	2								2		1							8	35	43
LG serózní	8	3	1																12	72	84
Světlobuněčný	1							1											2	13	15
Jiné	2	1			1			1	1	2	1			1					10	80	90
n.a.	25	18	3	1	2		1	1	1	3	2	1	1	2					61	148	209
Suma	229	94	13	13	10	4	3	3	2	14	8	6	3	11	1	0	0	0	414	906	1320

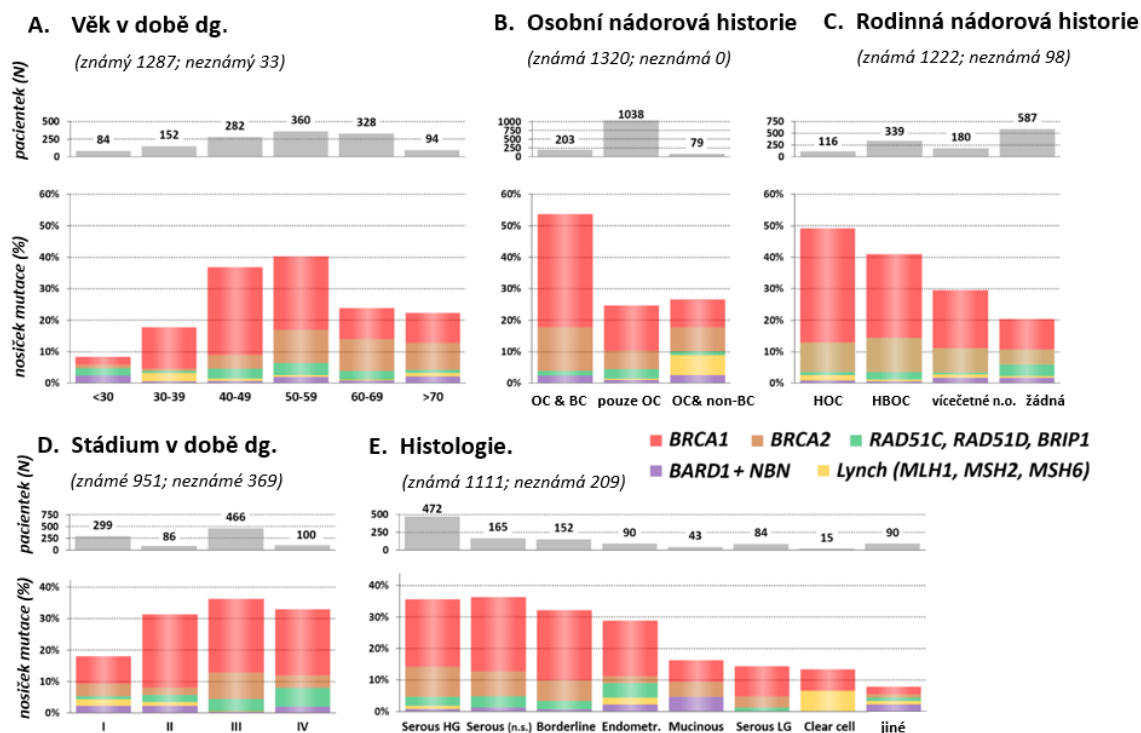
Tabulka 10 – klinicko-patologická charakteristika nosiček mutace v HBOC genech dle NCCN guidelines (nosičky mutace ve skupině 1320 pacientek s karcinomem ovaria po vyřazení 13 pacientek s dvěma a více mutacemi). Deset genů, které jsou signifikantně asociovány s rizikem vzniku karcinomu ovaria je zvýrazněno žlutě. **Vysvětlivky:** **n.a.** not available; **HOC**- hereditary ovarian cancer/dědičný karcinom ovaria; **HBOC**- hereditary breast and ovarian cancer/dědičný karcinom prsu a ovaria; **MCF**- Multiple cancer families/rodiny s vícečetným výskytem nádorového onemocnění; **OC**-ovarian cancer/karcinom ovaria; **BC**- breast cancer/karcinom prsu; **HG** -high grade; **LG** - low grade

Klinická a histopatologická charakteristika pozitivně testovaných patientek

Klinicko-patologické charakteristiky byly hodnoceny u pozitivně testovaných patientek s jednou nalezenou mutací v některém z 10 genů, které byly v naší populaci statisticky významně asociovány s vysokým či středně zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria (Tabulka 9, Tabulka 10).

Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k věku v době diagnózy

Nejvyšší frekvence mutací byla zachycena u patientek, kterým byl diagnostikován karcinom ovaria ve věku 40-49 let (37,4%) a 50-59 let (40,7%). Naopak nejnižší frekvence byla u patientek, u kterých byla diagnóza stanovena před 30. rokem života (8,3%) (Obrázek 12A). Ve frekvenci mutací v genech asociovaných s karcinomem ovaria jsme pozorovali významný rozdíl mezi nejstarší (70 a více let) a nejmladší (méně než 30 let) skupinou patientek (27/94; 28,7% vs. 13/84; 15,5%; $p=0,013$). Tento rozdíl byl primárně způsoben frekvencí mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* (18,1% u patientek ≥ 70 let vs. 3,6% u patientek <30 let), zatímco frekvence mutací v ostatních genech byla srovnatelná (4,8% vs. 4,3%). Průměrný věk v době diagnózy se lišil u nosiček mutace v genu *BRCA1* (medián 51,0 let, v rozmezí 23-78 let) a u nosiček mutace v genu *BRCA2* (medián 58,4 let, v rozmezí 27-78 let, $p=8,5 \times 10^{-10}$). V ostatních genech, ve kterých byly zachyceny mutace u nejméně 10 patientek, stoupal průměrný věk v době diagnózy u nosiček mutací v genu *RAD51C* (medián 52,2 let; v rozmezí 25-69 let), *NBN* (medián 54,5 let; v rozmezí 18-76 let), *RAD51D* (medián 56,0 let; v rozmezí 36-69 let) k *BRIP1* (medián 58,0 let; v rozmezí 30-71 let). Průměrný věk v době diagnózy pro nosičky mutace v MMR genech asociovaných s Lynchovým syndromem byl 46,0 let (v rozmezí 35-73 let), avšak i zde jsou rozdíly mezi jednotlivými geny. Pro *MSH6* byl průměrný věk patientek v době diagnózy 51,0 let (v rozmezí 35-73 let), zatímco pro *MLH1/MSH2* byl 44,1 let (v rozmezí 37-61 let).



Obrázek 12 - rozdělení nosiček mutací do klinicko-patologických podskupin podle: A) věku v době diagnózy, B) Osobní nádorové historie, C) Rodinné nádorové historie, D) Stádia v době diagnózy a E) histologie u 1320 pacientek s karcinomem ovaria.

Charakteristika nosičů mutace ve vztahu k osobní a rodinné nádorové anamnéze

Nejvyšší četnost mutací jsme zachytili u pacientek s nádorovou duplicitou karcinomu prsu a ovaria (109/203; 53,7%). U pacientek pouze s karcinomem ovaria byl záchyt mutací 24,7% (256/1038), podobnou frekvenci mutací jsme našli také u pacientek s diagnostikovaným karcinomem ovaria a dalším nádorovým onemocněním mimo karcinom prsu (21/79; 26,6%) (Obrázek 12B).

Nejčastěji byly nalezeny mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*. Nejvyšší frekvence *BRCA1/2* mutací jsme našli u pacientek s duplicitním onemocněním karcinomu prsu a ovaria (49,8%; 101/203). U pacientek pouze s karcinomem ovaria (20,1%; 209/1038) či s duplicitou karcinomu ovaria a jiného nádorového onemocnění (16,5%; 13/79) byla frekvence mutací v hlavních predispozičních genech výrazně nižší. Zatímco u pacientek s duplicitním nádorovým onemocněním karcinomu ovaria a dalšího nádoru mimo karcinom prsu a mutací

v MMR genech byl vedle karcinomu ovaria typicky diagnostikován karcinom kolorekta a endometria, u nosiček mutací v *BRCA1/2* ze stejné skupiny pacientek byla diagnostikována řada nádorů (nádory štítné žlázy, děložního čípku, močového měchýře, plic, pobřišnice, endometria či po melanomy i nemelanomové nádory kůže).

Frekvence mutací u pacientek z rodin s dědičným výskytem karcinomu ovaria byla 49,1% (Obrázek 12C). Nižší frekvenci mutací jsme zachytili v rodinách s výskytem karcinomu prsu a ovaria (41,0%) a v rodinách s vícečetným výskytem dalších nádorů (Multicancer families; MCF)(29,4%). Nejnížší, přesto však významnou frekvenci mutací v 10 genech predisponujících ke karcinomu ovaria jsme identifikovali u pacientek bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy (20,4%; 120/587), u kterých jsme zachytili téměř třetinu všech mutací (30,9%; 120/338). Pokles ve frekvenci mutací u pacientek s odlišnou rodinnou nádorovou anamnézou souvisel především s klesající frekvencí mutací v genech *BRCA1/2* v těchto skupinách pacientek. Patogenní mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* jsme našli u 45,7% (53/116) u pacientek z HOC rodin, 37,5% (127/339) pacientek z HBOC rodin, 26,1% (47/180) pacientek z MCF rodin a u 14,5% (85/587) pacientek bez rodinné nádorové historie.

Charakteristika nosičů mutace vzhledem ke stádiu a histologii onemocnění

Téměř u 60% pacientek byl karcinom ovaria diagnostikován ve stádiu III a IV dle FIGO klasifikace. Nosičky patogenních mutací v jednotlivých stádiích onemocnění tvořily přibližně třetinu pacientek (31,4% ve stádiu II; 35,8% ve stádiu III; 33,0% ve stádiu IV) s výjimkou žen s karcinomem ovaria ve stádiu I (18,1%) (Obrázek 12D). Je zajímavé, že u šesti z osmi pacientek s mutací v MMR genu (Lynchův syndrom) bylo onemocnění diagnostikováno ve stádiu I.

Podle frekvence mutací jsme mohli rozdělit histologické typy karcinomů ovaria do 2 skupin (Obrázek 12E). Podskupinu nádorů s vysokou frekvencí mutací (34,5%; 303/879 pacientek) představovaly HG/nespecifikované serózní, borderline a endometroidní nádory, zatímco do podskupiny s nízkou frekvencí mutací (12,1%; 28/232) spadaly LG serózní, mucinózní, světlouněčné a další vzácné histologické typy nádorů ovaria. Frekvence mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* byla u pacientek s HG serózním karcinomem ovaria více než dvakrát vyšší (30,9%; 146/472) než u pacientek s LG serózním histologickým typem nádoru (13,1%; 11/84). Distribuce mutací v genech *BRIP1/RAD51C/RAD51D* napříč histologickými typy byla

podobná jako u mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Nejnižší frekvence mutací (7,8%; 7/90) jsme našli i pacientek se vzácnými histologickými typy nádorů ovaria.

Mutace v dalších 201 analyzovaných genech

V další fázi této práce jsme hodnotili dalších 201 genů analyzovaných panelem CZECANCA. V těchto genech jsme našli 230 mutací v 89 genech u 208 pacientek (15,6%) (Tabulka 11A, B), přičemž 149 pacientek (11,2%) neslo mutaci pouze v některém z těchto 201 genů a 59 pacientek (4,4%) neslo zároveň mutaci i v jednom z 10 genů asociovaných s karcinomem ovaria.

Gen	Všechny pacientky (N=1,333)		Kontroly (N=2,278)		OR	95% CI		p
	N (Mut)	N (WT)	N (Mut)	N (WT)				
<i>PPM1D</i> ^{a)}	15	1318	2	2276	12,9	3,0	116,9	1,8E-05
<i>NAT1</i>	13	1320	5	2273	4,5	1,5	16,1	0,0027
<i>FAN1</i>	8	1325	6	2272	2,3	0,7	8,0	0,16
<i>MMP8</i>	6	1327	4	2274	2,6	0,6	12,4	0,19
<i>PMS1</i>	6	1327	3	2275	3,4	0,7	21,2	0,084
<i>HELQ</i>	6	1327	2	2276	5,1	0,9	52,2	0,058
<i>FANCG</i>	5	1328	2	2276	4,3	0,7	45,0	0,11
<i>EXO1</i>	5	1328	2	2276	4,3	0,7	45,0	0,11
<i>RECQL4</i>	5	1328	6	2272	1,4	0,3	5,6	0,55
<i>FANCM</i>	5	1328	6	2272	1,4	0,3	5,6	0,55
<i>SHPRH</i>	5	1328	1	2277	8,6	1,0	404,8	0,028
<i>FANCI</i>	5	1328	6	2272	1,4	0,3	5,6	0,55
<i>RAD50</i>	5	1328	5	2273	1,7	0,4	7,5	0,51
<i>RECQL</i>	4	1329	7	2271	1,0	0,2	3,8	1,00
<i>RECQL5</i>	4	1329	7	2271	1,0	0,2	3,8	1,00
<i>MCPH1</i>	4	1329	11	2267	0,6	0,1	2,1	0,59
<i>RAD54L</i>	4	1329	4	2274	1,7	0,3	9,2	0,48
<i>FANCD2</i>	3	1330	1	2277	5,1	0,4	269,3	0,15
<i>MLH3</i>	3	1330	3	2275	1,7	0,2	12,8	0,68
<i>FANCA</i>	3	1330	2	2276	2,6	0,3	30,8	0,37
<i>SETX</i>	3	1330	2	2276	2,6	0,3	30,8	0,37
<i>TELO2</i>	3	1330	4	2274	1,3	0,2	7,6	0,71
<i>MSR1</i>	3	1330	5	2273	1,0	0,2	5,3	1,00
<i>MSH3</i>	3	1330	9	2269	0,6	0,1	2,3	0,55
<i>RFC4</i>	3	1330	0	2278	n.a.			0,050
<i>ZNF365</i>	3	1330	0	2278	n.a.			0,050
<i>MPL</i>	3	1330	1	2277	5,1	0,4	269,3	0,15
<i>RAD18</i>	3	1330	1	2277	5,1	0,4	269,3	0,15
<i>ALK</i>	3	1330	3	2275	1,7	0,2	12,8	0,68
<i>SLX4</i>	3	1330	3	2275	1,7	0,2	12,8	0,68
<i>MUS81</i>	2	1331	1	2277	3,4	0,2	201,7	0,56
<i>NF1</i>	2	1331	1	2277	3,4	0,2	201,7	0,56
<i>XPA</i>	2	1331	1	2277	3,4	0,2	201,7	0,56
<i>DPYD</i>	2	1331	2	2276	1,7	0,1	23,6	0,63
<i>RNF168</i>	2	1331	2	2276	1,7	0,1	23,6	0,63
<i>OGG1</i>	2	1331	3	2275	1,1	0,1	10,0	1,00
<i>RAD51B</i>	2	1331	3	2275	1,1	0,1	10,0	1,00
<i>TLR2</i>	2	1331	3	2275	1,1	0,1	10,0	1,00
<i>FANCF</i>	2	1331	4	2274	0,9	0,1	6,0	1,00
<i>ATR</i>	2	1331	6	2272	0,6	0,1	3,2	0,72
<i>WRN</i>	2	1331	8	2270	0,4	0,0	2,1	0,34
<i>BLM</i>	2	1331	9	2269	0,4	0,0	1,8	0,35
<i>XRCC1</i>	2	1331	9	2269	0,4	0,0	1,8	0,35
<i>BUB1B</i>	2	1331	0	2278	n.a.			0,14
<i>ERCC5</i>	2	1331	0	2278	n.a.			0,14
<i>RAD52</i>	2	1331	0	2278	n.a.			0,14
<i>BRCC3</i>	2	1331	1	2277	3,4	0,2	201,7	0,56
<i>UIMC1</i>	2	1331	1	2277	3,4	0,2	201,7	0,56
<i>PLA2G2A</i>	2	1331	2	2276	1,7	0,1	23,6	0,63
<i>POLE</i>	2	1331	3	2275	1,1	0,1	10,0	1,00
<i>ATRIP</i>	2	1331	4	2274	0,9	0,1	6,0	1,00
<i>DNAJC21</i>	2	1331	4	2274	0,9	0,1	6,0	1,00
<i>ERCC3</i>	2	1331	10	2268	0,3	0,0	1,6	0,23
<i>ERCC6</i>	2	1331	0	2278	n.a.			0,14
<i>FAAP24</i>	2	1331	0	2278	n.a.			0,14
<i>APEX1</i>	2	1331	5	2273	0,7	0,1	4,2	1,00
<i>CASP8</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>DMC1</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00

<i>FANCE</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>FLCN</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>RAD1</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>SDHAF2</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>XRCC4</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>CWF19L2</i>	1	1332	2	2276	0,9	0,0	16,4	1,00
<i>POLD1</i>	1	1332	2	2276	0,9	0,0	16,4	1,00
<i>TLR4</i>	1	1332	2	2276	0,9	0,0	16,4	1,00
<i>NCAM1</i>	1	1332	3	2275	0,6	0,0	7,1	1,00
<i>PRF1</i>	1	1332	3	2275	0,6	0,0	7,1	1,00
<i>TSHR</i>	1	1332	3	2275	0,6	0,0	7,1	1,00
<i>LIG3</i>	1	1332	4	2274	0,4	0,0	4,3	0,66
<i>RAD54B</i>	1	1332	5	2273	0,3	0,0	3,1	0,42
<i>DCLRE1C</i>	1	1332	10	2268	0,2	0,0	1,2	0,064
<i>MDC1</i>	1	1332	13	2265	0,1	0,0	0,9	0,024
<i>BRAP</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>GRB7</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>HOXB13</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>CHEK1</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>LIG4</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>PTCH1</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>RAD9A</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>RUNX1</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>SBD5</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>TERF2</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>AIP</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>FAM175A</i>	1	1332	1	2277	1,7	0,0	134,1	1,00
<i>EPHX1</i>	1	1332	2	2276	0,9	0,0	16,4	1,00
<i>RBBP8</i>	1	1332	2	2276	0,9	0,0	16,4	1,00
<i>ERCC2</i>	1	1332	6	2272	0,3	0,0	2,3	0,27
<i>RFC1</i>	1	1332	0	2278	n.a.			0,37
<i>ATMIN</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>BABAM1</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>BRE</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>CSNK1D</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>CYLD</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>DDB2</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>ERCC4</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>EXT2</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>EYA2</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>FANCL</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>HUS1</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>KCNJ5</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>NELFB</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>NFKBIZ</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>NSD1</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>POLB</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>PRKDC</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>PTTG2</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>RHBDF2</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>TCL1A</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>TP53BP1</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>TSC1</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>UBE2V2</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>XPC</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>ZNF350</i>	0	1333	1	2277	0,0	0,0	66,6	1,00
<i>CEP57</i>	0	1333	2	2276	0,0	0,0	9,1	0,53
<i>FANCB</i>	0	1333	2	2276	0,0	0,0	9,1	0,53
<i>MUTYH</i>	0	1333	2	2276	0,0	0,0	9,1	0,53
<i>RFC1</i>	0	1333	2	2276	0,0	0,0	9,1	0,53
<i>XRCC2</i>	0	1333	2	2276	0,0	0,0	9,1	0,53
<i>XRCC3</i>	0	1333	2	2276	0,0	0,0	9,1	0,53
<i>ESR2</i>	0	1333	3	2275	0,0	0,0	4,1	0,30
<i>HNF1A</i>	0	1333	3	2275	0,0	0,0	4,1	0,30
<i>MSH5</i>	0	1333	3	2275	0,0	0,0	4,1	0,30
<i>PREX2</i>	0	1333	4	2274	0,0	0,0	2,6	0,30
<i>FANCC</i>	0	1333	5	2273	0,0	0,0	1,9	0,17
<i>SMAD4</i>	0	1333	5	2273	0,0	0,0	1,9	0,17
<i>AURKA</i>	0	1333	9	2269	0,0	0,0	0,9	0,031

Tabulka 11A - nalezené mutace v dalších 201 analyzovaných genech. Signifikantně asociované geny ($p < 0.05$) jsou zvýrazněny žlutě. Poznámka: ^{a)} jedna pacientka je nosičkou 2 mozaických trunkálních mutací v genu *PPM1D*.

	Negativní pac. (N=934)*		Controls (N=2,278)		OR	95% CI		p
	N (Mut)	N (WT)	N (Mut)	N (WT)				
PPM1D	12	922	2	2276	14.8	3.3	136.7	1.7E-05
NAT1	8	926	5	2273	3.9	1.1	15.3	0.0262
FANJ	5	929	6	2272	2.0	0.5	8.0	0.32
MMP8	6	928	4	2274	3.7	0.9	17.7	0.041
PMS1	5	929	3	2275	4.1	0.8	26.3	0.051
HELO	4	930	2	2276	4.9	0.7	54.1	0.063
FANCG	5	929	2	2276	6.1	1.0	64.4	0.025
EXO1	4	930	2	2276	4.9	0.7	54.1	0.063
RECQL4	4	930	6	2272	1.6	0.3	6.9	0.49
FANCM	3	931	6	2272	1.2	0.2	5.7	0.73
SHPRH	2	932	1	2277	4.9	0.3	287.9	0.20
FANCI	2	932	6	2272	0.8	0.1	4.6	1.00
RAD50	2	932	5	2273	1.0	0.1	6.0	1.00
RECQL	3	931	7	2271	1.0	0.2	4.6	1.00
RECQL5	3	931	7	2271	1.0	0.2	4.6	1.00
MCPH1	3	931	11	2267	0.7	0.1	2.5	0.77
RAD54L	2	932	4	2274	1.2	0.1	8.5	1.00
FANCD2	3	931	1	2277	7.3	0.6	384.5	0.077
MLH3	3	931	3	2275	2.4	0.3	18.3	0.37
FANCA	2	932	2	2276	2.4	0.2	33.7	0.58
SETX	2	932	2	2276	2.4	0.2	33.7	0.58
TEL02	2	932	4	2274	1.2	0.1	8.5	1.00
MSR1	2	932	5	2273	1.0	0.1	6.0	1.00
MSH3	2	932	9	2269	0.5	0.1	2.6	0.53
RFC4	2	932	0	2278	n.a.			0.084
ZNF365	2	932	0	2278	n.a.			0.084
MPL	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
RAD18	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
ALK	1	933	3	2275	0.8	0.0	10.1	1.00
SLX4	1	933	3	2275	0.8	0.0	10.1	1.00
MUS81	2	932	1	2277	4.9	0.3	287.9	0.20
NF1	2	932	1	2277	4.9	0.3	287.9	0.20
XPA	2	932	1	2277	4.9	0.3	287.9	0.20
DPYD	2	932	2	2276	2.4	0.2	33.7	0.58
RNF168	2	932	2	2276	2.4	0.2	33.7	0.58
OGG1	2	932	3	2275	1.6	0.1	14.2	0.63
RAD51B	2	932	3	2275	1.6	0.1	14.2	0.63
TLR2	2	932	3	2275	1.6	0.1	14.2	0.63
FANCF	2	932	4	2274	1.2	0.1	8.5	1.00
ATR	2	932	6	2272	0.8	0.1	4.6	1.00
WRN	2	932	8	2270	0.6	0.1	3.1	0.73
BLM	2	932	9	2269	0.5	0.1	2.6	0.53
XRCC1	2	932	9	2269	0.5	0.1	2.6	0.53
BUB1B	2	932	0	2278	n.a.			0.084
ERCC5	2	932	0	2278	n.a.			0.084
RAD52	2	932	0	2278	n.a.			0.084
BRCC3	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
UIMC1	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
PLA2G2A	1	933	2	2276	1.2	0.0	23.5	1.00
POLE	1	933	3	2275	0.8	0.0	10.1	1.00
ATRIP	1	933	4	2274	0.6	0.0	6.2	1.00
DNAJC21	1	933	4	2274	0.6	0.0	6.2	1.00
ERCC3	1	933	10	2268	0.2	0.0	1.7	0.19
ERCC6	1	933	0	2278	n.a.			0.29
FAAP24	1	933	0	2278	n.a.			0.29
APEX1	0	934	5	2273	0.0	0.0	2.7	0.33
CASP8	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
DMC1	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
FANCE	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
FLCN	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
RAD1	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
SDHAF2	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
XRCC4	1	933	1	2277	2.4	0.0	191.4	0.50
CWF19L2	1	933	2	2276	1.2	0.0	23.5	1.00
POLD1	1	933	2	2276	1.2	0.0	23.5	1.00
TLR4	1	933	2	2276	1.2	0.0	23.5	1.00
NCAM1	1	933	3	2275	0.8	0.0	10.1	1.00
PRF1	1	933	3	2275	0.8	0.0	10.1	1.00
TSHR	1	933	3	2275	0.8	0.0	10.1	1.00
LIG3	1	933	4	2274	0.6	0.0	6.2	1.00
RAD54B	1	933	5	2273	0.5	0.0	4.4	0.68
DCLRE1C	1	933	10	2268	0.2	0.0	1.7	0.19
MDC1	1	933	13	2265	0.2	0.0	1.2	0.080
BRAP	1	933	0	2278	n.a.			0.29
GRB7	1	933	0	2278	n.a.			0.29
HOXB13	1	933	0	2278	n.a.			0.29
CHEK1	1	933	0	2278	n.a.			0.29
LIG4	1	933	0	2278	n.a.			0.29
PTCH1	1	933	0	2278	n.a.			0.29
RAD9A	1	933	0	2278	n.a.			0.29
RUNX1	1	933	0	2278	n.a.			0.29
SBDS	1	933	0	2278	n.a.			0.29
TERF2	1	933	0	2278	n.a.			0.29
AIP	0	934	1	2277	0.0	0.0	95.0	1.00

<i>FAM175A</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>EPHX1</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>RBBP8</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>ERCC2</i>	0	934	6	2272	0,0	0,0	2,1	0,19
<i>RFC1</i>	0	934	0	2278	n.a.			1,00
<i>ATMIN</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>BABAM1</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>BRE</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>CSNK1D</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>CYLD</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>DDB2</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>ERCC4</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>EXT2</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>EYA2</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>FANCL</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>HUS1</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>KCNJ5</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>NELFB</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>NFKBIZ</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>NSD1</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>POLB</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>PRKDC</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>PTTG2</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>RHBDF2</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>TCLLA</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>TP53BP1</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>TSC1</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>UBE2V2</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>XPC</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>ZNF350</i>	0	934	1	2277	0,0	0,0	95,0	1,00
<i>CEP57</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>FANCB</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>MUTYH</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>RFC1</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>XRCC2</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>XRCC3</i>	0	934	2	2276	0,0	0,0	13,0	1,00
<i>ESR2</i>	0	934	3	2275	0,0	0,0	5,9	0,56
<i>HNFI1A</i>	0	934	3	2275	0,0	0,0	5,9	0,56
<i>MSH5</i>	0	934	3	2275	0,0	0,0	5,9	0,56
<i>PREX2</i>	0	934	4	2274	0,0	0,0	3,7	0,33
<i>FANCC</i>	0	934	5	2273	0,0	0,0	2,7	0,33
<i>SMAD4</i>	0	934	5	2273	0,0	0,0	2,7	0,33
<i>AURKA</i>	0	934	9	2269	0,0	0,0	1,2	0,067

Tabulka 11B - prevalence mutací v dalších 201 analyzovaných genech u 934 pacientek negativně testovaných na přítomnost patogenní mutace v 10 genech signifikantně asociovaných s rizikem zniku karcinomu ovaria.

Mutace v 201 genech byly vzácné. Vyšší prevalence mutací u pacientek v porovnání s populačně specifickými kontrolami jsme pozorovali u genů *PPMID*, *NAT1* a *SHPRH*. Po vyloučení nosiček mutací v 10 genech asociovaných s karcinomem ovaria byly s vyšším rizikem vzniku tohoto onemocnění asociovány mutace v genech *PPMID*, *NAT1*, *MMP8* a *FANCG* (Tabulka 12).

Gen	Pacientky N Mutací (%)	2,278 PSK N Mutací (%)	OR (95% CI); p (Bonferroni korekce p)
<i>Všechny OC pacientky (1,333)</i>			
PPMID	16 (1,20)	2 (0,09)	13,82 (3,24 - 124,22); $7,4 \times 10^{-6}$ (0,001)
NAT1	13 (0,98)	5 (0,22)	4,48 (1,49 - 16,07); 0,003 (n.s.)
SHPRH	5 (0,38)	1 (0,04)	8,57 (0,96 - 404,83); 0,028 (n.s.)
<i>934 OC pacientek bez mutace v nějakém z 10 genů signifikantně asociovaných s karcinomem ovaria</i>			
PPMID	12 (1,28)	2 (0,09)	14,80 (3,28 - 136,67); $1,7 \times 10^{-5}$ (0,003)
NAT1	8 (0,86)	5 (0,22)	3,96 (1,13 - 15,30); 0,026 (n.s.)
MMP8	6 (0,64)	4 (0,18)	3,67 (0,87 - 17,74); 0,041 (n.s.)
FANCG	5 (0,53)	2 (0,09)	6,12 (1,00 - 64,45); 0,025 (n.s.)

Tabulka 12 - dalších 201 analyzovaných genů asociovaných s rizikem vzniku karcinomu ovaria ve skupině všech pacientek a ve skupině 934 pacientek bez známe mutace v nějakém z 10 genů signifikantně asociovaných s rizikem vzniku karcinomu ovaria v naší populaci. **Vysvětlivky:** n.s., non-significant/nesignifikantní.

Po Bonferroniho korekci u pacientek bez zárodečné mutace v některém z genů asociovaných s karcinomem ovaria byly s karcinomem ovaria statisticky významně ($p=0,003$) asociovány pouze mutace v genu *PPMID*. Všechny mutace v genu *PPMID* byly přítomny ve formě mozaiky s minoritní alelickou frekvencí (MAF) od 14% do 60% u pacientek a od 17% do 19% u kontrol. Všechny odběry krve za účelem genetického testování byly u pacientek s pozitivním záchytem mutace v genu *PPMID* provedeny po zahájení chemoterapie (v průměru 38 měsíců, rozmezí 4 měsíce až 7,1 roku). Sedm z 15 nosiček mutace v genu *PPMID* neslo zároveň mutaci v některém z DNA reparačních genů ($3 \times BRCA2$, $1 \times PALB2$, $1 \times EXO1$ a $1 \times PMS1$). MAF v *PPMID* nekorelovala s věkem v době diagnózy ani s dobou od poslední chemoterapie (Tabulka 13).

ID	Věk v době dg.	Centrum	Exon	c.	p.	WT reads	MUT reads	MAF	odběr gen. vzorku	poslední chemot.	odběr vzorku od poslední chemo(roky)	jiné pathogenní mut.
3094	43.9	VFN	6	c.C1528T	p.Q510X	89	14	0,14	21-04-2016	15-08-2012	3,68	-
cz1475	56.0	VFN	6	c.1632dupC	p.G544fs	128	52	0,29	n.a.	n.a.	n.a.	-
306_16	59.0	MOU	6	c.1524delG	p.M508fs	129	35	0,21	n.a.	n.a.	n.a.	EXO1
2480	59.7	VFN	6	c.1449dupT	p.T483fs	106	18	0,15	24-04-2014	14-03-2007	7,11	-
1897	60.1	VFN	6	c.C1403G	p.S468X	69	13	0,16	12-04-2012	23-06-2009	2,80	-
CZE239	63.0	ANJ	6	c.C1372T	p.R458X	65	15	0,19	n.a.	n.a.	n.a.	-
2045	64.8	VFN	6	c.1529delA	p.Q510fs	84	52	0,38	n.a.	n.a.	n.a.	BRCA2
3120	64.8	VFN	6	c.1449delT	p.T483fs	178	33	0,16	n.a.	n.a.	n.a.	BRCA2
5263_17	65.0	GEN	1	c.325delG	p.G109fs	106	19	0,15	n.a.	n.a.	n.a.	BRCA2
			6	c.1286delG	p.R429fs	29	43	0,60				
1804	66.3	VFN	6	c.A1645T	p.K549X	76	12	0,14	8-12-2011	14-09-2005	6,23	-
4179	66.5	VFN	6	c.C1654T	p.R552X	106	22	0,17	14-06-2018	17-01-2018	0,41	-
10018_17	67.0	GEN	6	c.G1270T	p.E424X	51	9	0,15	n.a.	n.a.	n.a.	-
2915	67.2	VFN	6	c.1386_1387del	p.462_463del	49	25	0,34	3-11-2015	25-06-2015	0,36	PALB2
8395_17	70.0	GEN	6	c.1612delT	p.L538X	77	49	0,39	n.a.	n.a.	n.a.	-
1822	70.5	VFN	6	c.1607delG	p.R536fs	93	22	0,19	12-01-2012	14-12-2010	1,08	PMS1

Tabulka 13 - charakteristika 15 pacientek s nalezenou mutací v genu *PPM1D*.

Mutace v genech *PPM1D* a *SHPRH* byly statisticky významně asociovány s věkem v době diagnózy >60 let ($p=0,001$). Frekvence mutací v genu *NAT1* byla v jednotlivých klinicko-patologických kategoriích podobná (Tabulka 14).

Kategorie	N pacientek	NAT1	PPM1D	SHPRH	Σ	%
Věk v době diagnózy (roky)						
30-39	152	4			4	2,63
40-49	282	2	1	1	4	1,42
50-59	360	3	3	1	7	1,94
60-69	328	3	9	3	15	4,57
>70	94	1	2		3	3,19
Osobní historie						
pouze OC	1043	9	11	3	23	2,21
OC & BC	210	2	2	1	5	2,38
OC & jiné nádor. onemocnění	78	2	2	1	5	6,41
Rodinná historie						
HBOC	345	2	4	1	7	2,03
HOC	119	2	1		3	2,52
MCF	182	1	1	1	3	1,65
Žádná	588	6	9	3	18	3,06
n.a.	99	2			2	2,02

Histologie						
HG serózní	478	3	5	3	11	2,30
LG serózní	85		1		1	1,18
Serózní nespecifikovaný	165	2	4	1	7	4,24
Endometroidní	90		3		3	3,33
Světlobuněčný	15	1			1	6,67
Jiná	90	1			1	1,11
Borderline	154	3			3	1,95
n.a.	213	3	2	1	6	2,82
Σ	1333	13	16	5	34	2,55

Tabulka 14 - klinicko-patologická charakteristika nosiček mutací v genech *NAT1*, *PPM1D*, and *SHPRH*.

Vysvětlivky: **n.a.** not available; **HOC**-hereditary ovarian cancer/dědičný karcinom ovaria; **HBOC**- hereditary breast and ovarian cancer/dědičný karcinom prsu a ovaria; **MCF**-Multiple cancer families/rodiny s vícečetným výskytem nádorového onemocnění; **OC**-ovarian cancer/karcinom ovaria; **BC**- breast cancer/karcinom prsu; **HG** -high grade; **LG** - low grade

DISKUZE

Naše práce zabývající se genetickou predispozicí ke karcinomu ovaria představuje s analýzou 1333 pacientek s karcinomem ovaria a 2278 populačních kontrol dosud největší studii české i slovanské populace. V první fázi jsme se zaměřili na hodnocení patogenních variant v 18 genech uvedených v současných doporučeních NCCN jako geny asociované s vysokým/zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria. Z těchto 18 predispozičních genů jsme prokázali statisticky významně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria pro nosičky zárodečných patogenních mutací v 10 predispozičních genech. Patogenní mutace v některém z těchto 10 genů byla nalezena u 29,9% (399/1333) pacientek a 1,4% (31/2278) populačních kontrol (Obrázek 11). Mutace v ostatních osmi genech buď nebyly zachyceny vůbec (*CDKN2A* a *NF1*) či velmi vzácně (*CDH1*, *PTEN*, *STK11* a *TP53*) nebo se frekvence výskytu jejich mutací ve skupině pacientek kontrol významně nelišila (*ATM*, *PALB2*). Mutace v genech *BRCA1/2*, *RAD51C/D* a genech Lynchova syndromu byly spojeny s vysokým rizikem vzniku karcinomu ovaria a mutace v *BRIP1* se středním rizikem (Tabulka 9), což odpovídá předchozím studiím (King, Marks et al. 2003, Loveday, Turnbull et al. 2011, Rafnar, Gudbjartsson et al. 2011, Loveday, Turnbull et al. 2012, Loveday, Turnbull et al. 2012). Nejčastěji jsme zárodečné mutace identifikovali v genech *BRCA1* (17,9% pacientek) a *BRCA2* (7,4% pacientek). Nosičky mutací v *BRCA1/2* představovaly 84% všech pozitivně testovaných pacientek. Z ostatních osmi genů asociovaných s karcinomem ovaria jsme nejvíce mutací našli v *RAD51C/RAD51D/BRIP1* (celkem 5% pacientek). Podobné frekvence popisují i zahraniční studie (Bonache, Esteban et al. 2018, Koczkowska, Krawczynska et al. 2018, Krivokuca, Boljevic et al. 2019). Zárodečné mutace v MMR genech byly dohromady asociovány s vysokým rizikem vzniku karcinomu ovaria, přičemž nejvíce mutací jsme našli v genu *MLH1*, podobně jako je tomu u pacientů s Lynchovým syndromem s diagnózou kolorektálního karcinomu (Lynch and de la Chapelle 2003). Vysoká frekvence zárodečných mutací

v predispozičních genech u pacientek s karcinomem ovaria analyzovaných v naší práci je v souladu řadou studií provedených v jiných populacích (Walsh, Casadei et al. 2011, Harter, Hauke et al. 2017, Koczkowska, Krawczynska et al. 2018, Krivokuca, Boljevic et al. 2019), nicméně jiné práce uvádí výrazně nižší frekvenci mutací (Lilyquist, LaDuca et al. 2017, Carter, Marshall et al. 2018). Naše studie ukazuje, na rozdíl od jiných prací (Ramus, Song et al. 2015, Lu, Li et al. 2018), asociaci mutací v *NBN* a *BARD1* se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu ovaria. Naopak pro nosičky mutací v genech *ATM* a *PALB2* jsme významně zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria nepozorovali, podobně jako v některé další práce (Ramus, Song et al. 2015, Lu, Li et al. 2018, Kurian, Ward et al. 2019). Pro přesné stanovení asociace genů středního rizika s karcinomem ovaria jsou nezbytné rozsáhlé studie pacientek spolu s analýzou populačně specifických kontrol či segregací analýzy v rodinách nosiček mutací podobně jako v případě genu *PALB2* (Yang, Leslie et al. 2020). U pacientek s karcinomem ovaria jsme našli zvýšenou frekvenci mutací v genu *CHEK2*, nicméně tyto výsledky nedosáhly, na rozdíl od naší předchozí práce, statistické významnosti (Kleiblova, Stolarova et al. 2019). Zřejmým důvodem je absence sond cílících poslední 4 exony genu *CHEK2* v panelu CZEKANCA (Soukupova, Zemankova et al. 2018). Tyto dotčené 4 exony byly v předchozí studii analyzovány separátně. V genu *NF1* jsme nezachytili žádnou patogenní mutaci. Mutace v genech *CDH1* a *PTEN* byly extrémně vzácné (v každém z obou genů jsme našli jednu patogenní zárodečnou mutaci). Podobně tomu bylo v případě mutací v genu *STK11*, ve kterém jsme v našem souboru pacientek našli 2 patogenní mutace. Mutace v *STK11* jsou spojeny s Peutz-Jeghers syndromem (Banno, Kisu et al. 2013), jež se může manifestovat neepiteliálním karcinomem ovaria, jako tomu bylo i u našich pacientek s mutací v *STK11*. Celkově vysoká četnost mutací v genech predisponujících ke karcinomu ovaria v naší práci může přispívat k vysoké incidenci karcinomu ovaria v naší populaci.

Velké genomové přestavby v některém z 10 genů asociovaných s karcinomem ovaria byly nalezeny u 31/1333 pacientek (2,3%) a představovaly 7,6% patogenních mutací v těchto genech. Nejčastěji byly CNVs nalezeny v genu *BRCA1* (23x). Tyto výsledky korespondují se studií Lilyquist a kolektivu, kteří ve své práci publikovali frekvenci CNVs 7,5% (Lilyquist, LaDuca et al. 2017).

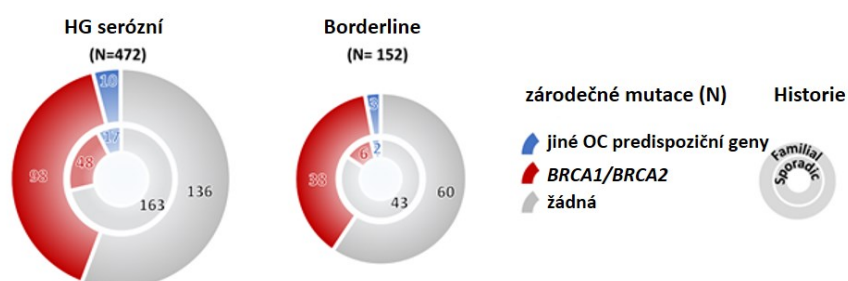
Vyšetření panelu genů u pacientek s karcinomem ovaria odhalilo 13 nosiček mutací ve více než jenom genu (1,0% pacientek). Podobná frekvence vícenásobných nosiček mutací (multilocus inherited neoplasia alleles syndrome; MINAS (Whitworth, Skytte et al. 2016)) byla ukázána v předchozích studiích (Stradella, Del Valle et al. 2018, Whitworth, Smith et al. 2018) a má význam zejména pro genetické poradenství v rodinách. Vícenásobné nosičky mutací vykazovaly klinické symptomy typické pro více penetrantní alelu. U pacientky s mutací v *BRCA1* a *MLH1* byl krom karcinomu prsu a ovaria diagnostikován rovněž karcinom endometria, tedy jedna z charakteristických manifestací Lynchova syndromu.

U 1320 pacientek s maximálně jednou patogenní mutací v některém z 10 genů asociovaných s rizikem vzniku karcinomu ovaria v naší práci jsme analyzovali dostupná kliniko-patologická data (Obrázek 12). Největší četnost mutací v *BRCA1/2* jsme zachytili ve skupině pacientek s duplicitním onemocněním karcinomu prsu a ovaria, zatímco mutace v genech *RAD51C/RAD51D/BRIP1* se dominantně vyskytovaly u pacientek pouze s diagnózou karcinomu ovaria. Distribuce mutací *RAD51C/RAD51D/BRIP1* v jednotlivých historických subtypech však byla podobná jako v případě *BRCA1/2*. Mutace *RAD51C/RAD51D/BRIP1* v naší práci převažovaly ve skupině pacientek bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy (22/587; 3,7%), zatímco ve francouzské studii Castera a kolektivu byly popsány mutace v uvedených genech dominantně u žen s výskytem karcinomu ovaria v rodině (Castera, Harter et al. 2018). Dalším zajímavým zjištěním byla překvapivě vysoká frekvence mutací v genech predisponujících ke karcinomu ovaria u starších pacientek. Prevalence mutací u žen starších 60

let byla v naší práci 23,6%, zatímco Harter a kol. ve své práci uvádí mutace u 18,9% žen této věkové skupiny, přičemž četnost mutací u žen mladších 60 let byla podobná (32,6% vs. 33,2%). U patientek mladších 60 let v době diagnózy dominovaly mutace v *BRCA1*, zatímco u patientek starších 60 let byla frekvence mutací v *BRCA1* a *BRCA2* porovnatelná. Tomu odpovídá i vyšší medián věku v době diagnózy pro nosičky mutací v genu *BRCA2* (58,4 roku) oproti *BRCA1* (51 let). Zajímavým zjištěním byl rovněž nález 29 mutací v *BRCA1/2* ve skupině 208 patientek (13,9%) starších 60 let s negativní rodinnou nádorovou anamnézou, na rozdíl od studie Morgan a kolektivu, kteří identifikovali u 46 žen se sporadickým karcinomem ovaria starších 60 let pouze 2 (4,3%) mutace v genech *BRCA1/2* (Morgan, Burghel et al. 2019). Vysokou frekvenci mutací *BRCA1/2* (~18%) jsme našli i ve skupině nejstarších patientek s diagnózou po 70. roku věku, zatímco v jiných studiích nepřesahovala frekvence mutací v *BRCA1/2* v této věkové kategorii patientek 10% (Plaskocinska, Shipman et al. 2016, Rust, Spiliopoulou et al. 2018). Vysoká frekvence mutací *BRCA1/2* u nejstarší věkové kategorie kontrastuje s neočekávaně nízkou četností mutací u nejmladší analyzované skupiny patientek, kterým v době diagnózy bylo méně než 30 let a u kterých jsme našli mutace v *BRCA1/2* pouze v 3,6% případech ($p=0,003$). Rozdíl ve frekvenci mutací v *BRCA1/2* byl ještě významnější u patientek se sporadickým karcinomem ovaria (bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy), čímž jsme vyloučili vliv možného výraznějšího zastoupení patientek s pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou ve skupině nejstarších patientek. U 46 patientek se sporadickým karcinomem vaječníků diagnostikovaných po 70. roce věku jsme zachytili 6 mutací *BRCA1/2* (13,3%), avšak žádnou mutaci ve skupině 52 patientek se sporadickým karcinomem ovaria diagnostikovaných do 30 let věku. Ačkoliv se u velmi mladých žen častěji vyskytují vzácné histologické tumory ovaria, které nejsou na rozdíl od invazivních epiteliálních nádorů výrazně asociovány s mutacemi v *BRCA1/2*, v uvedené skupině 52 velmi mladých žen se sporadickým

karcinomem ovaria přesto invazivní epiteliální ovariální karcinomy tvořily přibližně dvě třetiny případů (65,3%; 32/49 informativních pacientek).

Na základě frekvence mutací v 10 genech predisponujících karcinomu ovaria lze histologické typy nádorů ovaria rozdělit do dvou skupin. Vysokou frekvenci mutací jsme pozorovali u HG-serózních, borderline a endometroidních nádorů, druhou skupinu s nízkou prevalencí mutací představovaly LG-serózní, mucinózní, světlouněčné a další vzácné nádory ovaria. Poněkud překvapivě byla frekvence mutací u pacientek s BTO srovnatelná s frekvencí mutací s pacientkami s HG-serózním karcinomem ovaria (32,2% vs. 36,7%). Pro vyloučení vlivu rodinné nádorové anamnézy jsme analyzovali frekvenci mutací u sporadických HG-serózních karcinomů a BTO. U pacientek se sporadickým BTO byla frekvence mutací poloviční oproti sporadickým HG-serózním případům, nicméně i přesto frekvence mutací výrazně přesahovala 10%, což ukazuje na opodstatněnost genetického testování i u pacientek s BTO (Obrázek 13).



Obrázek 13 - frekvence mutací v 10 BC/OC predispozičních genech signifikantně asociovaných s rizikem vzniku karcinomu ovaria u pacientek s HG serózním a borderline typem nádoru. Pacientky byly rozděleny do podskupin na základě pozitivní (výskyt nádorového onemocnění v rodině) nebo negativní (sporadická forma nádorového onemocnění) rodinné historie.

Vysoká frekvence mutací u pacientek s BTO a zároveň s pozitivní rodinnou nádorovou anamnézou naznačuje, že BTO mohou být manifestací nádorové predispozice. V současné době jsou však informace o BTO u nosiček *BRCA1/2* velmi omezené a je nutné toto zjištění ověřit analýzou větší skupiny pacientek a v dalších populacích.

Většina serózních karcinomů ovaria je diagnostikována v pokročilém stádiu a je spojena s nepříznivou prognózou (Levanon, Crum et al. 2008). Také v naší studii převažovaly pacientky s pokročilým stádiem onemocnění. Výjimku tvořily pouze pacientky, které byly nosičkami mutací v MMR reparačních genech, u kterých byl nádor, častěji endometroidní karcinom, diagnostikován spíše v časnějších stádiích. Podobný trend byl popsán v práci Watson a kolektivu (Watson, Butzow et al. 2001). Přestože v našem souboru byl celkový počet mutací identifikovaných v genech MMR dráhy malý, nejvyšší frekvence mutací byla zachycena v genu *MLH1*, podobně jako u pacientů s Lynchovým syndromem s diagnózou karcinomu kolorekta (Lynch and de la Chapelle 2003). Nicméně byly publikovány i studie, ve kterých u pacientek s karcinomem ovaria převažovaly mutace v genech *MSH6* a *PMS2* (Song, Cicek et al. 2014, Norquist, Harrell et al. 2016). V našem souboru nebyl gen *PMS2* analyzován.

Panelové sekvenování umožňuje identifikaci dalších potenciálně kandidátních genů asociovaných se zvýšením rizika karcinomu ovaria. V naší studii jsme v rámci dalších 201 testovaných genů našli řadu truncačních mutací. Nicméně zvýšený výskyt mutací ve skupině pacientek s karcinomem ovaria jsme pozorovali pouze v případě genů *PPMID*, *NAT1* a *SHPRH*. Po Bonferroniho korekci zohledňující multigenové testování byl jediným kandidátem gen *PPMID* kódující fosfatázu WIP1. Ve všech případech se jednalo o „gain-of-function“ mutace vedoucí ke zvýšené fosfatázové aktivitě WIP1 a mutace byly, podobně jako v jiných studiích, přítomny ve formě mozaiky (Kleiblova, Shaltiel et al. 2013, Ruark, Snape et al. 2013, Akbari, Lepage et al. 2014). Všechny mutace v genu *PPMID* nalezené v souboru našich pacientek byly identifikovány ve vzorku krve získaném po chemoterapeutické léčbě, což vede k předpokladu, že tyto mutace mají somatický původ (Pharoah, Song et al. 2016). Záradečné mutace genu *NAT1*, který kóduje arylamin N-acetyltransferázu 1 zapojenou v metabolismu karcinogenů, nebyly doposud v souvislosti s rizikem vzniku karcinomu ovaria analyzovány. Existují však studie poukazující na modifikaci rizika vzniku různých nádorových onemocnění

v případě některých polymorfismů v tomto genu (Butcher and Minchin 2012, Hein, Fakis et al. 2018). Gen *SHPRH* kóduje E3 ubikvitin ligázu, která během poškození DNA cílí na PCNA protein (Seelinger and Otterlei 2020). Vztah mutací v genu *SHPRH* k riziku vzniku karcinomu ovaria není znám. Frekvence mutací ve všech potenciálně kandidátních genech v naší studii byla nízká. Pro určení výše rizika vzniku karcinomu ovaria bude potřeba mnohonásobně větších case-control studií, segreganční analýzy v rodinách a funkční analýzy.

Mimo výše uvedené možné kandidátní geny jsme také našli vzácné mutace v genech rodiny Fanconiho anemie. Tyto geny kódují proteiny účastníci se reparace meziřetězcových spojů DNA vláken (Nalepa and Clapp 2018). Některé z genů FA rodiny patří mezi známé predispoziční geny pro karcinom ovaria. Jedná se o geny *BRCA1* (*FANCS*), *BRCA2* (*FANCD1*), *RAD51C* (*FANCO*), *PALB2* (*FANCN*) a *BRIP1* (*FANCI*). V dalších FA genech (*FANCG*, *FANCD2* a *FANCA*) jsme mutace identifikovali u 11/1333 (0,83%) patientek a 5/2278 (0,2%) populačně specifických kontrol s kumulativním OR=3,78 (95% CI 1,21-13,91; $p=0,02$). Zajímavé je, že tyto vzácné mutace byly nalezeny téměř výhradně u patientek bez mutace v některém z 10 genů asociovaných s karcinomem ovaria.

Populační skríníng nádorové predispozice je stále předmětem velké diskuze (Gabai-Kapara, Lahad et al. 2014, Manchanda, Patel et al. 2018, Turnbull, Sud et al. 2018, Best, Tucker et al. 2019, Zhang, Bao et al. 2019). Skríníng vysoce penetrantních genů, jako jsou geny *BRCA1* a *BRCA2*, by umožnil klinickou intervenci u pozitivně testovaných, dosud asymptomatických jedinců vedoucí k dramatickému snížení rizika vzniku nádorového onemocnění. V tomto směru je vhodné zmínit, že v naší práci jsme patogenní mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* našli u 14,5% patientek s karcinomem ovaria bez pozitivní rodinné nádorové anamnézy. Tyto ženy ve vysokém riziku vzniku onemocnění nemohou být v současné době presymptomaticky identifikovány. Lze předpokládat, že populační skríníng by mohl vést ke snížení incidence karcinomu ovaria v populaci. Na druhou stranu je případný populační skríníng i vysoce

penetrantních genů spojen s velkým množstvím především etických problému a bude vyžadovat rozsáhlou multioborovou i celospolečenskou diskuzi. Genetické testování má pro pacientky také prognostický a terapeutický význam. Mutace v *BRCA1/2* (Ledermann, Harter et al. 2014, Ledermann, Harter et al. 2015, George, Kaye et al. 2017) a dalších predispozičních genech asociovaných se vznikem karcinomu ovaria (Chandran and Kennedy 2018, Ngoi, Tay et al. 2018) představují důležitý prediktivní marker pro léčbu karcinomu ovaria.

ZÁVĚR

V naší studii jsme ukázali, že téměř třetina patientek s karcinomem ovaria v naší populaci nese zárodečnou mutaci v některém z genů signifikantně asociovaných s rizikem vzniku karcinomu ovaria. Frekvence patogenních mutací v těchto genech převyšovala hranici 10% ve všech klinicko-patologických podskupinách patientek, tedy bez ohledu na věk v době diagnózy, či klinické nebo histopatologické charakteristiky, s výjimkou velmi mladých žen s diagnózou karcinomu ovaria do 30 let a žen se vzácným histologickým typem nádoru. V ČR je v současné době indikována ke genetickému testování každá žena s invazivním karcinomem ovaria. Naše studie potvrdila opodstatněnost rozšíření indikačních kritérií. V naší práci jsme zachytili vysokou frekvenci mutací také u patientek s BTO, naopak mutace *BRCA1/2* nebyly asociovány se vznikem sporadického karcinomu ovaria u velmi mladých žen. Mimo zavedené geny jsme prokázali statisticky významnou asociaci mutací v genech *NBN* a *BARD1* se středním rizikem vzniku karcinomu ovaria, nicméně pro přesné určení výše rizika či význam mutací v těchto genech ve smyslu prognostickém a prediktivním bude vyžadovat další analýzy. Identifikace dalších genů s prediktivním a/nebo prognostickým potenciálem bude, vzhledem k jejich nízké frekvenci mutací, vyžadovat analýzy rozsáhlých skupin patientek a mezinárodní spolupráci.

SEZNAM ZKRATEK

BTO	Borderline tumor/ tumory s nejasným maligním potenciálem
CNV	Copy number variation/ variabilita počtu kopií úseků DNA
dAMP	Deoxyadenosine monophosphate/deoxyadenosine monofosát
DDR	DNA damage network/dráha oprav poškození DNA
DSB	Double strand breaks/dvouřetězcové zlomy DNA vlákna
dTNP	Deoxyribonucleotide triphosphate/deoxyribonukleotid trifosfát
FA	Fanconi anemia/Fanconioho anémie
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICL	Interstrand crosslinks/meziřetězcová spojení
IGV	Integrative Genomics Viewer
INDELS	Insertion–deletion mutations/malé inserce a delece
LGS	Low-grade serous carcinoma/ Low-grade serózní karcinom
LM-PCR	Ligation-Mediated polymerase chain reaction
MAF	Minor allele frequency/minoritní alelická frekvence
MCF	Multiple cancer families/rodiny s výskytem více typů nádorových onemocnění
MGMT	O6-methylguanin-DNA methyltransferáza
MINAS	Multilocus inherited neoplasia alleles syndrome
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MMR	Mismatch repair/oprava nesprávně spárovaných bazí
MRI	Magnetic resonance imaging/magnetická rezonance
N	number/počet
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NER	Nucleotide excision repair/nukleotidová excizní reparace
NGS	Next generation sequencing/sekvenování nové generace
NHEJ	Non-homologous end joining/ nehomologní spojování konců
OC	Ovarian cancer/karcinom ovaria
OR	Odds Ratio
PCNA	Protein Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction/polymerázová řetězová reakce

PEG	polyethylenglykol
PJS	Peutz-Jeghersův syndrom
PNK	Polynukleotide kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RR	Relative risk/relativní riziko
RRSO	Riziko-redukující salpingooforektomie
SNVs	Single nucleotide variants/jednonukleotidové varianty
ssDNA	Single strand DNA/jednořetězcová DNA
STK11	Serin/Threonin kinase 11
TC NER	Transcription-coupled NER/oprava spojená s transkripcí
TNBC	Triple-negative breast cancer
VCF	Variant-call formát
VUS	Variant of unknown significance/varianta nejasného významu
WT	Wild type/divoká forma

Modrá kniha České onkologické společnosti (2020). Brno, Masarykův onkologický ústav.

Adessi, C., G. Matton, G. Ayala, G. Turcatti, J. J. Mermod, P. Mayer and E. Kawashima (2000). "Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms." Nucleic Acids Res **28**(20): E87.

Ahnesorg, P., P. Smith and S. P. Jackson (2006). "XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining." Cell **124**(2): 301-313.

Akbari, M. R., P. Lepage, B. Rosen, J. McLaughlin, H. Risch, M. Minden and S. A. Narod (2014). "PPM1D mutations in circulating white blood cells and the risk for ovarian cancer." J Natl Cancer Inst **106**(1): djt323.

Akbari, M. R., P. Tonin, W. D. Foulkes, P. Ghadirian, M. Tischkowitz and S. A. Narod (2010). "RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer patients." Breast Cancer Res **12**(4): 404.

Al-Sukhni, W., H. Rothenmund, A. E. Borgida, G. Zogopoulos, A. M. O'Shea, A. Pollett and S. Gallinger (2008). "Germline BRCA1 mutations predispose to pancreatic adenocarcinoma." Hum Genet **124**(3): 271-278.

Alter, B. P. (1996). "Fanconi's anemia and malignancies." Am J Hematol **53**(2): 99-110.

Alter, B. P., N. Giri, S. A. Savage and P. S. Rosenberg (2018). "Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up." Haematologica **103**(1): 30-39.

Anand, R., A. Jasrotia, D. Bundschuh, S. M. Howard, L. Ranjha, M. Stucki and P. Cejka (2019). "NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation." Embo j **38**(7).

Antoniou, A., P. D. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord, J. L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D. M. Eccles, N. Tang, E. Olah, H. Anton-Culver, E. Warner, J. Lubinski, J. Gronwald, B. Gorski, H. Tulinius, S. Thorlacius, H. Eerola, H. Nevanlinna, K. Syrjäkoski, O. P. Kallioniemi, D. Thompson, C. Evans, J. Peto, F. Lalloo, D. G. Evans and D. F. Easton (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." Am J Hum Genet **72**(5): 1117-1130.

Ayi, T. C., J. T. Tsan, L. Y. Hwang, A. M. Bowcock and R. Baer (1998). "Conservation of function and primary structure in the BRCA1-associated RING domain (BARD1) protein." Oncogene **17**(16): 2143-2148.

Ayoub, N., E. Rajendra, X. Su, A. D. Jeyasekharan, R. Mahen and A. R. Venkitaraman (2009). "The carboxyl terminus of Brca2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry." Curr Biol **19**(13): 1075-1085.

Badie, S., C. Liao, M. Thanasoula, P. Barber, M. A. Hill and M. Tarsounas (2009). "RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation." J Cell Biol **185**(4): 587-600.

Banno, K., I. Kisu, M. Yanokura, K. Masuda, A. Ueki, Y. Kobayashi, A. Hirasawa and D. Aoki (2013). "Hereditary gynecological tumors associated with Peutz-Jeghers syndrome (Review)." Oncol Lett **6**(5): 1184-1188.

Barrow, E., J. Hill and D. G. Evans (2013). "Cancer risk in Lynch Syndrome." Fam Cancer **12**(2): 229-240.

Baute, J. and A. Depicker (2008). "Base excision repair and its role in maintaining genome stability." Crit Rev Biochem Mol Biol **43**(4): 239-276.

Beggs, A. D., A. R. Latchford, H. F. Vasen, G. Moslein, A. Alonso, S. Aretz, L. Bertario, I. Blanco, S. Bulow, J. Burn, G. Capella, C. Colas, W. Friedl, P. Moller, F. J. Hes, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, F. M. Nagengast, Y. Parc, R. K. Phillips, W. Hyer, M. Ponz de Leon, L. Renkonen-Sinisalo, J. R. Sampson, A. Stormorken, S. Tejpar, H. J. Thomas, J. T. Wijnen, S. K. Clark and S. V. Hodgson (2010). "Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management." Gut **59**(7): 975-986.

Bentley, D. R., S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow, G. P. Smith, J. Milton, C. G. Brown, K. P. Hall, D. J. Evers, C. L. Barnes, H. R. Bignell, J. M. Boutell, J. Bryant, R. J. Carter, R. Keira Cheetham, A. J. Cox, D. J. Ellis, M. R. Flatbush, N. A. Gormley, S. J. Humphray, L. J. Irving, M. S. Karbelashvili, S. M. Kirk, H. Li, X. Liu, K. S. Maisinger, L. J. Murray, B. Obradovic, T. Ost, M. L. Parkinson, M. R. Pratt, I. M. J. Rasolonjatovo, M. T. Reed, R. Rigatti, C. Rodighiero, M. T. Ross, A. Sabot, S. V. Sankar, A. Scally, G. P. Schroth, M. E. Smith, V. P. Smith, A. Spiridou, P. E. Torrance, S. S. Tzonev, E. H. Vermaas, K. Walter, X. Wu, L. Zhang, M. D. Alam, C. Anastasi, I. C. Aniebo, D. M. D. Bailey, I. R. Bancarz, S. Banerjee, S. G. Barbour, P. A. Baybayan, V. A. Benoit, K. F. Benson, C. Bevis, P. J. Black, A. Boodhun, J. S. Brennan, J. A. Bridgham, R. C. Brown, A. A. Brown, D. H. Buermann, A. A. Bundu, J. C. Burrows, N. P. Carter, N. Castillo, M. Chiara E. Catenazzi, S. Chang, R. Neil Cooley, N. R. Crake, O. O. Dada, K. D. Diakoumakos, B. Dominguez-Fernandez, D. J. Earnshaw, U. C. Egbujor, D. W. Elmore, S. S. Etchin, M. R. Ewan, M. Fedurco, L. J. Fraser, K. V. Fuentes Fajardo, W. Scott Furey, D. George, K. J. Gietzen, C. P. Goddard, G. S. Golda, P. A. Granieri, D. E. Green, D. L. Gustafson, N. F. Hansen, K. Harnish, C. D. Haudenschield, N. I. Heyer, M. M. Hims, J. T. Ho, A. M. Horgan, K. Hoschler, S. Hurwitz, D. V. Ivanov, M. Q. Johnson, T. James, T. A. Huw Jones, G.-D. Kang, T. H. Kerelska, A. D. Kersey, I. Khrebtukova, A. P. Kindwall, Z. Kingsbury, P. I. Kokko-Gonzales, A. Kumar, M. A. Laurent, C. T. Lawley, S. E. Lee, X. Lee, A. K. Liao, J. A. Loch, M. Lok, S. Luo, R. M. Mammen, J. W. Martin, P. G. McCauley, P. McNitt, P. Mehta, K. W. Moon, J. W. Mullens, T. Newington, Z. Ning, B. Ling Ng, S. M. Novo, M. J. O'Neill, M. A. Osborne, A. Osnowski, O. Ostadan, L. L. Paraschos, L. Pickering, A. C. Pike, A. C. Pike, D. Chris Pinkard, D. P. Pliskin, J. Podhasky, V. J. Quijano, C. Raczy, V. H. Rae, S. R. Rawlings, A. Chiva Rodriguez, P. M. Roe, J. Rogers, M. C. Rogert Bacigalupo, N. Romanov, A. Romieu, R. K. Roth, N. J. Rourke, S. T. Ruediger, E. Rusman, R. M. Sanches-Kuiper, M. R. Schenker, J. M. Seoane, R. J. Shaw, M. K. Shiver, S. W. Short, N. L. Sizto, J. P. Sluis, M. A. Smith, J. Ernest Sohna Sohna, E. J. Spence, K. Stevens, N. Sutton, L. Szajkowski, C. L. Tregidgo, G. Turcatti, S. vandeVondele, Y. Verhovsky, S. M. Virk, S. Wakelin, G. C. Walcott, J. Wang, G. J. Worsley, J. Yan, L. Yau, M. Zuerlein, J. Rogers, J. C. Mullikin, M. E. Hurles, N. J. McCooke, J. S. West, F. L. Oaks, P. L. Lundberg, D. Klenerman, R. Durbin and A. J. Smith (2008). "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry." *Nature* **456**: 53.

Best, A. F., M. A. Tucker, M. N. Frone, M. H. Greene, J. A. Peters and H. A. Katki (2019). "A Pragmatic Testing-Eligibility Framework for Population Mutation Screening: The Example of BRCA1/2." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **28**(2): 293-302.

Bonache, S., I. Esteban, A. Moles-Fernandez, A. Tenes, L. Duran-Lozano, G. Montalban, V. Bach, E. Carrasco, N. Gadea, A. Lopez-Fernandez, S. Torres-Esquius, F. Mancuso, G. Caratu, A. Vivancos, N. Tuset, J. Balmana, S. Gutierrez-Enriquez and O. Diez (2018). "Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings." *J Cancer Res Clin Oncol* **144**(12): 2495-2513.

Borecka, M., P. Zemankova, F. Lhota, J. Soukupova, P. Kleiblova, M. Vocka, P. Soucek, I. Ticha, Z. Kleibl and M. Janatova (2016). "The c.657del5 variant in the NBN gene predisposes to pancreatic cancer." *Gene* **587**(2): 169-172.

Bouda J, P. J., Vlasák P, Kost'un J, Slunéčko R. (2018). "Nový pohled na etiopatogenezi ovariálního karcinomu." *Actual Gyn.* **10**: 19-22.

Buck, D., L. Malivert, R. de Chasseval, A. Barraud, M. C. Fondaneche, O. Sanal, A. Plebani, J. L. Stephan, M. Hufnagel, F. le Deist, A. Fischer, A. Durandy, J. P. de Villartay and P. Revy (2006). "Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly." *Cell* **124**(2): 287-299.

Butcher, N. J. and R. F. Minchin (2012). "Arylamine N-acetyltransferase 1: a novel drug target in cancer development." *Pharmacol Rev* **64**(1): 147-165.

Candido-dos-Reis, F. J., H. Song, E. L. Goode, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, M. C. Larson, K. Alsop, E. Dicks, P. Harrington, S. J. Ramus, A. de Fazio, G. Mitchell, S. Fereday, K. L. Bolton, C. Gourley, C. Michie, B. Karlan, J. Lester, C. Walsh, I. Cass, H. Olsson, M. Gore, J. J. Benitez, M. J. Garcia, I. Andrulis, A. M. Mulligan, G. Glendon, I. Blanco, C. Lazaro, A. S. Whittemore, V. McGuire, W. Sieh, M. Montagna, E. Alducci, S. Sadetzki, A. Chetrit, A. Kwong, S. K. Kjaer, A. Jensen, E. Hogdall, S. Neuhausen, R. Nussbaum, M. Daly, M. H. Greene, P. L. Mai, J. T. Loud, K. Moysich, A. E. Toland, D. Lambrechts, S. Ellis, D. Frost, J. D. Brenton, M. Tischkowitz, D. F. Easton, A. Antoniou, G. Chenevix-Trench, S. A. Gayther, D. Bowtell and P. D. Pharoah (2015). "Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **21**(3): 652-657.

- Cannavo, E. and P. Cejka (2014). "Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks." Nature **514**(7520): 122-125.
- Cantor, S. B., D. W. Bell, S. Ganesan, E. M. Kass, R. Drapkin, S. Grossman, D. C. Wahrer, D. C. Sgroi, W. S. Lane, D. A. Haber and D. M. Livingston (2001). "BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function." Cell **105**(1): 149-160.
- Carney, J. P., R. S. Maser, H. Olivares, E. M. Davis, M. Le Beau, J. R. Yates, 3rd, L. Hays, W. F. Morgan and J. H. Petrini (1998). "The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response." Cell **93**(3): 477-486.
- Carter, N. J., M. L. Marshall, L. R. Susswein, K. K. Zorn, S. Hiraki, K. J. Arvai, R. I. Torene, A. K. McGill, L. Yackowski, P. D. Murphy, Z. Xu, B. D. Solomon, R. T. Klein and K. S. Hruska (2018). "Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors." Gynecol Oncol **151**(3): 481-488.
- Casari, E., C. Rinaldi, A. Marsella, M. Gnugnoli, C. V. Colombo, D. Bonetti and M. P. Longhese (2019). "Processing of DNA Double-Strand Breaks by the MRX Complex in a Chromatin Context." Frontiers in molecular biosciences **6**: 43-43.
- Castera, L., V. Harter, E. Muller, S. Krieger, N. Goardon, A. Ricou, A. Rousselin, G. Paimparay, A. Legros, O. Bruet, C. Quesnelle, F. Domin, C. San, B. Brault, R. Fouillet, C. Abadie, O. Bera, P. Berthet, C. French Exome Project, T. Frebourg and D. Vaur (2018). "Landscape of pathogenic variations in a panel of 34 genes and cancer risk estimation from 5131 HBOC families." Genet Med **20**(12): 1677-1686.
- Ceccaldi, R., P. Sarangi and A. D. D'Andrea (2016). "The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions." Nat Rev Mol Cell Biol **17**(6): 337-349.
- Chandran, E. A. and I. Kennedy (2018). "Significant Tumor Response to the Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Heavily Pretreated Patient With Ovarian Carcinosarcoma Harboring a Germline RAD51D Mutation." JCO Precision Oncology(2): 1-4.
- Chen, S. and G. Parmigiani (2007). "Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance." J Clin Oncol **25**(11): 1329-1333.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, W. P. Roos and B. Kaina (2003). "Mechanisms of human DNA repair: an update." Toxicology **193**(1-2): 3-34.
- Cooke, S. L. and J. D. Brenton (2011). "Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer." Lancet Oncol **12**(12): 1169-1174.
- Couch, F. J., H. Shimelis, C. Hu, S. N. Hart, E. C. Polley, J. Na, E. Hallberg, R. Moore, A. Thomas, J. Lilyquist, B. Feng, R. McFarland, T. Pesaran, R. Huether, H. LaDuca, E. C. Chao, D. E. Goldgar and J. S. Dolinsky (2017). "Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer." JAMA oncology **3**(9): 1190-1196.
- Couch, F. J., H. Shimelis, C. Hu, S. N. Hart, E. C. Polley, J. Na, E. Hallberg, R. Moore, A. Thomas, J. Lilyquist, B. Feng, R. McFarland, T. Pesaran, R. Huether, H. LaDuca, E. C. Chao, D. E. Goldgar and J. S. Dolinsky (2017). "Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer." JAMA Oncol **3**(9): 1190-1196.
- Cybulski, C., D. Wokolorczyk, W. Kluzniak, A. Jakubowska, B. Gorski, J. Gronwald, T. Huzarski, A. Kashyap, T. Byrski, T. Debniak, A. Golab, B. Gliniewicz, A. Sikorski, J. Switala, T. Borkowski, A. Borkowski, A. Antczak, L. Wojnar, J. Przybyla, M. Sosnowski, B. Malkiewicz, R. Zdrojowy, P. Sikorska-Radek, J. Matych, J. Wilkosz, W. Rozanski, J. Kis, K. Bar, P. Bryniarski, A. Paradysz, K. Jersak, J. Niemirowicz, P. Slupski, P. Jarzowski, M. Skrzypczyk, J. Dobruch, P. Domagala, S. A. Narod and J. Lubinski (2013). "An inherited NBN mutation is associated with poor prognosis prostate cancer." Br J Cancer **108**(2): 461-468.
- Daly, M. B., R. Pilarski, M. Berry, S. S. Buys, M. Farmer, S. Friedman, J. E. Garber, N. D. Kauff, S. Khan, C. Klein, W. Kohlmann, A. Kurian, J. K. Litton, L. Madlensky, S. D. Merajver, K. Offit, T. Pal, G. Reiser, K. M.

- Shannon, E. Swisher, S. Vinayak, N. C. Voian, J. N. Weitzel, M. J. Wick, G. L. Wiesner, M. Dwyer and S. Darlow (2017). "NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017." J Natl Compr Canc Netw **15**(1): 9-20.
- Davies, A. A., J. Y. Masson, M. J. Mcllwraith, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, A. R. Venkitaraman and S. C. West (2001). "Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein." Mol Cell **7**(2): 273-282.
- de Jager, M., J. van Noort, D. C. van Gent, C. Dekker, R. Kanaar and C. Wyman (2001). "Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends." Mol Cell **8**(5): 1129-1135.
- Digweed, M. and K. Sperling (2004). "Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1207-1217.
- Dundr, P. (2010). "[Ovarian carcinoma: current diagnostic principles]." Cesk Patol **46**(3): 53-61.
- Duval, A. and R. Hamelin (2002). "Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers." Ann Genet **45**(2): 71-75.
- Edwards, S. M., Z. Kote-Jarai, J. Meitz, R. Hamoudi, Q. Hope, P. Osin, R. Jackson, C. Southgate, R. Singh, A. Falconer, D. P. Dearnaley, A. Arden-Jones, A. Murkin, A. Dowe, J. Kelly, S. Williams, R. Oram, M. Stevens, D. M. Teare, B. A. Ponder, S. A. Gayther, D. F. Easton and R. A. Eeles (2003). "Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene." Am J Hum Genet **72**(1): 1-12.
- El-Khamisy, S. F., M. Masutani, H. Suzuki and K. W. Caldecott (2003). "A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage." Nucleic Acids Res **31**(19): 5526-5533.
- Eng, C. (2003). "PTEN: one gene, many syndromes." Hum Mutat **22**(3): 183-198.
- Esteller, M., S. R. Hamilton, P. C. Burger, S. B. Baylin and J. G. Herman (1999). "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia." Cancer Res **59**(4): 793-797.
- Fedeles, B. I., V. Singh, J. C. Delaney, D. Li and J. M. Essigmann (2015). "The AlkB Family of Fe(II)/ α -Ketoglutarate-dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond." J Biol Chem **290**(34): 20734-20742.
- Fedurco, M., A. Romieu, S. Williams, I. Lawrence and G. Turcatti (2006). "BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies." Nucleic acids research **34**(3): e22-e22.
- Ferlay, J., D. M. Parkin and E. Steliarova-Foucher (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." European Journal of Cancer **46**(4): 765-781.
- Fischerova, D., M. Zikan, P. Dundr and D. Cibula (2012). "Diagnosis, treatment, and follow-up of borderline ovarian tumors." Oncologist **17**(12): 1515-1533.
- Foretova, L., M. Navratilova, M. Svoboda, P. Vasickova, E. H. Stahlova, J. Hazova, P. Kleiblova, Z. Kleibl, E. Machackova, M. Palacova and K. Petrakova (2019). "Recommendations for Preventive Care for Women with Rare Genetic Cause of Breast and Ovarian Cancer." Klin Onkol **32**(Supplementum2): 6-13.
- Foretová, L., E. Macháčková, M. Palácová, M. Navrátilová, M. Svoboda and K. Petráková (2016). "[Recommended Extension of Indication Criteria for Genetic Testing of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome]." Klin Onkol **29 Suppl 1**: S9-13.
- Gabai-Kapara, E., A. Lahad, B. Kaufman, E. Friedman, S. Segev, P. Renbaum, R. Beeri, M. Gal, J. Grinshpun-Cohen, K. Djemal, J. B. Mandell, M. K. Lee, U. Beller, R. Catane, M. C. King and E. Levy-Lahad (2014). "Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(39): 14205-14210.

- Gayther, S. A., P. Russell, P. Harrington, A. C. Antoniou, D. F. Easton and B. A. Ponder (1999). "The contribution of germline BRCA1 and BRCA2 mutations to familial ovarian cancer: no evidence for other ovarian cancer-susceptibility genes." *Am J Hum Genet* **65**(4): 1021-1029.
- George, A., S. Kaye and S. Banerjee (2017). "Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer." *Nat Rev Clin Oncol* **14**(5): 284-296.
- Goodman, M. T., H. L. Howe, K. H. Tung, J. Hotes, B. A. Miller, S. S. Coughlin and V. W. Chen (2003). "Incidence of ovarian cancer by race and ethnicity in the United States, 1992–1997." *Cancer* **97**(120): 2676-2685.
- Gorski, B., T. Debniak, B. Masojc, M. Mierzejewski, K. Medrek, C. Cybulski, A. Jakubowska, G. Kurzawski, M. Chosia, R. Scott and J. Lubinski (2003). "Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients." *Int J Cancer* **106**(3): 379-381.
- Gottipati, P., B. Vischioni, N. Schultz, J. Solomons, H. E. Bryant, T. Djureinovic, N. Issaeva, K. Sleeth, R. A. Sharma and T. Helleday (2010). "Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells." *Cancer Res* **70**(13): 5389-5398.
- Grawunder, U., D. Zimmer, S. Fugmann, K. Schwarz and M. R. Lieber (1998). "DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes." *Mol Cell* **2**(4): 477-484.
- Gronwald, J., J. Lubinski, T. Huzarski, C. Cybulski, J. Menkiszak, M. Siolek, M. Stawicka, P. Sun, S. J. Kim, J. Kotsopoulos and S. A. Narod (2019). "A comparison of ovarian cancer mortality in women with BRCA1 mutations undergoing annual ultrasound screening or preventive oophorectomy." *Gynecol Oncol* **155**(2): 270-274.
- Gupta, R., S. Sharma, J. A. Sommers, M. K. Kenny, S. B. Cantor and R. M. Brosh, Jr. (2007). "FANCD1 (BACH1) helicase forms DNA damage inducible foci with replication protein A and interacts physically and functionally with the single-stranded DNA-binding protein." *Blood* **110**(7): 2390-2398.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Harter, P., J. Hauke, F. Heitz, A. Reuss, S. Kommoss, F. Marme, A. Heimbach, K. Prieske, L. Richters, A. Burges, G. Neidhardt, N. de Gregorio, A. El-Balat, F. Hilpert, W. Meier, R. Kimmig, K. Kast, J. Sehouli, K. Baumann, C. Jackisch, T. W. Park-Simon, L. Hanker, S. Krober, J. Pfisterer, H. Gevensleben, A. Schnelzer, D. Dietrich, T. Neunhoffer, M. Krockenberger, S. Y. Brucker, P. Nürnberg, H. Thiele, J. Altmüller, J. Lamla, G. Elser, A. du Bois, E. Hahnen and R. Schmutzler (2017). "Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1)." *PLoS One* **12**(10): e0186043.
- Hartlerode, A. J. and R. Scully (2009). "Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells." *Biochem J* **423**(2): 157-168.
- Hauke, J., J. Horvath, E. Groß, A. Gehrig, E. Honisch, K. Hackmann, G. Schmidt, N. Arnold, U. Faust, C. Sutter, J. Hentschel, S. Wang-Gohrke, M. Smogavec, B. H. F. Weber, N. Weber-Lassalle, K. Weber-Lassalle, J. Borde, C. Ernst, J. Altmüller, A. E. Volk, H. Thiele, V. Hübbel, P. Nürnberg, K. Keupp, B. Versmold, E. Pohl, C. Kubisch, S. Grill, V. Paul, N. Herold, N. Lichey, K. Rhiem, N. Ditsch, C. Ruckert, B. Wappenschmidt, B. Auber, A. Rump, D. Niederacher, T. Haaf, J. Ramser, B. Dworniczak, C. Engel, A. Meindl, R. K. Schmutzler and E. Hahnen (2018). "Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer." *Cancer medicine* **7**(4): 1349-1358.
- Hein, D. W., G. Fakis and S. Boukouvala (2018). "Functional expression of human arylamine N-acetyltransferase NAT1*10 and NAT1*11 alleles: a mini review." *Pharmacogenet Genomics* **28**(10): 238-244.
- Helder-Woolderink, J. M., E. A. Blok, H. F. Vasen, H. Hollema, M. J. Mourits and G. H. De Bock (2016). "Ovarian cancer in Lynch syndrome; a systematic review." *Eur J Cancer* **55**: 65-73.

Herrington, C. S. (1999). "Tumors of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube and Broad Ligament. Atlas of Tumor Pathology. Third Series, Fascicle 23 Robert E. Scully, Robert H. Young and Philip B. Clement. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1998. No. of pages: 527. Price: \$95.00. ISBN: 1 881041 43 3." The Journal of Pathology **189**(1): 145-145.

Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.

Holland, M. (2019). "MLPA® General Protocol- Instructions For Use, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

General Protocol for the detection and quantification of DNA sequences." Retrieved 1 March 2019.

Howlett, N. G., T. Taniguchi, S. Olson, B. Cox, Q. Waisfisz, C. De Die-Smulders, N. Persky, M. Grompe, H. Joenje, G. Pals, H. Ikeda, E. A. Fox and A. D. D'Andrea (2002). "Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia." Science **297**(5581): 606-609.

Hsieh, P. and K. Yamane (2008). "DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing." Mech Ageing Dev **129**(7-8): 391-407.

Hu, C., E. C. Polley, S. Yadav, J. Lilyquist, H. Shimelis, J. Na, S. N. Hart, D. E. Goldgar, S. Shah, T. Pesaran, J. S. Dolinsky, H. LaDuca and F. J. Couch (2020). "The contribution of germline predisposition gene mutations to clinical subtypes of invasive breast cancer from a clinical genetic testing cohort." J Natl Cancer Inst.

Ip, S. C., U. Rass, M. G. Blanco, H. R. Flynn, J. M. Skehel and S. C. West (2008). "Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast." Nature **456**(7220): 357-361.

Irminger-Finger, I. and W. C. Leung (2002). "BRCA1-dependent and independent functions of BARD1." Int J Biochem Cell Biol **34**(6): 582-587.

Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**: 1071.

Jacquemont, C. and T. Taniguchi (2007). "Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation." Cancer Res **67**(15): 7395-7405.

Jefford, C. E., A. Feki, J. Harb, K. H. Krause and I. Irminger-Finger (2004). "Nuclear-cytoplasmic translocation of BARD1 is linked to its apoptotic activity." Oncogene **23**(20): 3509-3520.

Kanaar, R., J. H. Hoeijmakers and D. C. van Gent (1998). "Molecular mechanisms of DNA double strand break repair." Trends Cell Biol **8**(12): 483-489.

Kast, K., K. Rhiem, B. Wappenschmidt, E. Hahnen, J. Hauke, B. Bluemcke, V. Zarghooni, N. Herold, N. Ditsch, M. Kiechle, M. Braun, C. Fischer, N. Dikow, S. Schott, N. Rahner, D. Niederacher, T. Fehm, A. Gehrig, C. Mueller-Reible, N. Arnold, N. Maass, G. Borck, N. de Gregorio, C. Scholz, B. Auber, R. Varon-Manteeva, D. Speiser, J. Horvath, N. Lichey, P. Wimberger, S. Stark, U. Faust, B. H. Weber, G. Emons, S. Zachariae, A. Meindl, R. K. Schmutzler and C. Engel (2016). "Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer." J Med Genet **53**(7): 465-471.

Kaurah, P., A. MacMillan, N. Boyd, J. Senz, A. De Luca, N. Chun, G. Suriano, S. Zaor, L. Van Manen, C. Gilpin, S. Nikkel, M. Connolly-Wilson, S. Weissman, W. S. Rubinstein, C. Sebold, R. Greenstein, J. Stroop, D. Yim, B. Panzini, W. McKinnon, M. Greenblatt, D. Wirtzfeld, D. Fontaine, D. Coit, S. Yoon, D. Chung, G. Lauwers, A. Pizzuti, C. Vaccaro, M. A. Redal, C. Oliveira, M. Tischkowitz, S. Olschwang, S. Gallinger, H. Lynch, J. Green, J. Ford, P. Pharoah, B. Fernandez and D. Huntsman (2007). "Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer." Jama **297**(21): 2360-2372.

Kee, Y. and A. D. D'Andrea (2012). "Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia." J Clin Invest **122**(11): 3799-3806.

Kennedy, R. D. and A. D. D'Andrea (2006). "DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes." J Clin Oncol **24**(23): 3799-3808.

King, M. C., J. H. Marks, J. B. Mandell and G. New York Breast Cancer Study (2003). "Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2." Science **302**(5645): 643-646.

Kleibl, Z. and V. N. Kristensen (2016). "Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management." Breast **28**: 136-144.

Kleiblova, P., I. A. Shaltiel, J. Benada, J. Sevcik, S. Pechackova, P. Pohlreich, E. E. Voest, P. Dundr, J. Bartek, Z. Kleibl, R. H. Medema and L. Macurek (2013). "Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint." J Cell Biol **201**(4): 511-521.

Kleiblova, P., L. Stolarova, K. Krizova, F. Lhota, J. Hojny, P. Zemankova, O. Havranek, M. Vocka, M. Cerna, K. Lhotova, M. Borecka, M. Janatova, J. Soukupova, J. Sevcik, M. Zimovjanova, J. Kotlas, A. Panczak, K. Vesela, J. Cervenкова, M. Schneiderova, M. Burocziova, K. Burdova, V. Stranecky, L. Foretova, E. Machackova, S. Tavandzis, S. Kmoch, L. Macurek and Z. Kleibl (2019). "Germline CHEK2 Gene Mutations in Hereditary Breast Cancer Predisposition - Mutation Types and their Biological and Clinical Relevance." Klin Onkol **32**(Supplementum2): 36-50.

Kleiblova, P., L. Stolarova, K. Krizova, F. Lhota, J. Hojny, P. Zemankova, O. Havranek, M. Vocka, M. Cerna, K. Lhotova, M. Borecka, M. Janatova, J. Soukupova, J. Sevcik, M. Zimovjanova, J. Kotlas, A. Panczak, K. Vesela, J. Cervenкова, M. Schneiderova, M. Burocziova, K. Burdova, V. Stranecky, L. Foretova, E. Machackova, S. Tavandzis, S. Kmoch, L. Macurek and Z. Kleibl (2019). "Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer." Int J Cancer.
Knies, K., S. Inano, M. J. Ramirez, M. Ishiai, J. Surrallés, M. Takata and D. Schindler (2017). "Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFWF3 cause Fanconi anemia." J Clin Invest **127**(8): 3013-3027.

Koczkowska, M., N. Krawczynska, M. Stukan, A. Kuzniacka, I. Brozek, M. Sniadecki, J. Debniak, D. Wydra, W. Biernat, P. Kozłowski, J. Limon, B. Wasag and M. Ratajska (2018). "Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients." Cancers (Basel) **10**(11).
Kottemann, M. C. and A. Smogorzewska (2013). "Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks." Nature **493**(7432): 356-363.

Kreso, A. and J. E. Dick (2014). "Evolution of the cancer stem cell model." Cell Stem Cell **14**(3): 275-291.

Krivokuca, A., I. Boljevic, S. Jovandic, Z. Magic, A. Mandic, Z. Tomasevic and M. Brankovic-Magic (2019). "Germline mutations in cancer susceptibility genes in high grade serous ovarian cancer in Serbia." J Hum Genet.
Kuchenbaecker, K. B., J. L. Hopper, D. R. Barnes, K. A. Phillips, T. M. Mooij, M. J. Roos-Blom, S. Jervis, F. E. van Leeuwen, R. L. Milne, N. Andrieu, D. E. Goldgar, M. B. Terry, M. A. Rookus, D. F. Easton, A. C. Antoniou, L. McGuffog, D. G. Evans, D. Barrowdale, D. Frost, J. Adlard, K. R. Ong, L. Izatt, M. Tischkowitz, R. Eeles, R. Davidson, S. Hodgson, S. Ellis, C. Nogues, C. Lasset, D. Stoppa-Lyonnet, J. P. Fricker, L. Faivre, P. Berthet, M. J. Hooning, L. E. van der Kolk, C. M. Kets, M. A. Adank, E. M. John, W. K. Chung, I. L. Andrulis, M. Southey, M. B. Daly, S. S. Buys, A. Osorio, C. Engel, K. Kast, R. K. Schmutzler, T. Caldes, A. Jakubowska, J. Simard, M. L. Friedlander, S. A. McLachlan, E. Machackova, L. Foretova, Y. Y. Tan, C. F. Singer, E. Olah, A. M. Gerdes, B. Arver and H. Olsson (2017). "Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers." Jama **317**(23): 2402-2416.

Kurian, A. W., K. C. Ward, N. Howlader, D. Deapen, A. S. Hamilton, A. Mariotto, D. Miller, L. S. Penberthy and S. J. Katz (2019). "Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients." J Clin Oncol: JCO1801854.

Kurian, A. W., K. C. Ward, N. Howlader, D. Deapen, A. S. Hamilton, A. Mariotto, D. Miller, L. S. Penberthy and S. J. Katz (2019). "Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients." J Clin Oncol **37**(15): 1305-1315.

Kurman, R. J. and M. Shih Ie (2016). "The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded." Am J Pathol **186**(4): 733-747.

Kurumizaka, H., S. Ikawa, M. Nakada, R. Enomoto, W. Kagawa, T. Kinebuchi, M. Yamazoe, S. Yokoyama and T. Shibata (2002). "Homologous pairing and ring and filament structure formation activities of the human Xrcc2*Rad51D complex." J Biol Chem **277**(16): 14315-14320.

Lane, D. and A. Levine (2010). "p53 Research: the past thirty years and the next thirty years." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(12): a000893.

Ledermann, J., P. Harter and C. Gourley (2015). "Correction to Lancet Oncol 2014; 15: 856. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial." Lancet Oncol **16**(4): e158.

Ledermann, J., P. Harter, C. Gourley, M. Friedlander, I. Vergote, G. Rustin, C. L. Scott, W. Meier, R. Shapira-Frommer, T. Safra, D. Matei, A. Fielding, S. Spencer, B. Dougherty, M. Orr, D. Hodgson, J. C. Barrett and U. Matulonis (2014). "Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial." Lancet Oncol **15**(8): 852-861.

Levanon, K., C. Crum and R. Drapkin (2008). "New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact." J Clin Oncol **26**(32): 5284-5293.

Levitus, M., Q. Waisfisz, B. C. Godthelp, Y. de Vries, S. Hussain, W. W. Wiegant, E. Elghalbzouri-Maghrani, J. Steltenpool, M. A. Rooimans, G. Pals, F. Arwert, C. G. Mathew, M. Z. Zdzienicka, K. Hiom, J. P. De Winter and H. Joenje (2005). "The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J." Nat Genet **37**(9): 934-935.

Lhota, F., P. Zemankova, P. Kleiblova, J. Soukupova, M. Vocka, V. Stranecky, M. Janatova, H. Hartmannova, K. Hodanova, S. Kmoch and Z. Kleibl (2016). "Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2-negatively tested breast cancer patients." Clin Genet.

Lhotova, K., L. Stolarova, P. Zemankova, M. Vocka, M. Janatova, M. Borecka, M. Cerna, S. Jelinkova, J. Kral, Z. Volkova, M. Urbanova, P. Kleiblova, E. Machackova, L. Foretova, J. Hazova, P. Vasickova, F. Lhota, M. Koudova, L. Cerna, S. Tavandzis, J. Indrakova, L. Hruskova, M. Kosarova, R. Vrtel, V. Stranecky, S. Kmoch, M. Zikan, L. Macurek, Z. Kleibl and J. Soukupova (2020). "Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer." Cancers (Basel) **12**(4).

Lieber, M. R. (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." J Biol Chem **283**(1): 1-5. Lilyquist, J., H. LaDuca, E. Polley, B. T. Davis, H. Shimelis, C. Hu, S. N. Hart, J. S. Dolinsky, F. J. Couch and D. E. Goldgar (2017). "Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls." Gynecol Oncol **147**(2): 375-380.

Liu, Y., J. Y. Masson, R. Shah, P. O'Regan and S. C. West (2004). "RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells." Science **303**(5655): 243-246.

London, T. B., L. J. Barber, G. Mosedale, G. P. Kelly, S. Balasubramanian, I. D. Hickson, S. J. Boulton and K. Hiom (2008). "FANCD1 is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts." J Biol Chem **283**(52): 36132-36139.

Loveday, C., C. Turnbull, E. Ramsay, D. Hughes, E. Ruark, J. R. Frankum, G. Bowden, B. Kalmyrzaev, M. Warren-Perry, K. Snape, J. W. Adlard, J. Barwell, J. Berg, A. F. Brady, C. Brewer, G. Brice, C. Chapman, J. Cook, R. Davidson, A. Donaldson, F. Douglas, L. Greenhalgh, A. Henderson, L. Izatt, A. Kumar, F. Laloo, Z. Miedzybrodzka, P. J. Morrison, J. Paterson, M. Porteous, M. T. Rogers, S. Shanley, L. Walker, C. Breast Cancer Susceptibility, D. Eccles, D. G. Evans, A. Renwick, S. Seal, C. J. Lord, A. Ashworth, J. S. Reis-Filho, A. C. Antoniou and N. Rahman (2011). "Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer." Nat Genet **43**(9): 879-882.

Loveday, C., C. Turnbull, E. Ramsay, D. Hughes, E. Ruark, J. R. Frankum, G. Bowden, B. Kalmyrzaev, M. Warren-Perry, K. Snape, J. W. Adlard, J. Barwell, J. Berg, A. F. Brady, C. Brewer, G. Brice, C. Chapman, J. Cook, R. Davidson, A. Donaldson, F. Douglas, L. Greenhalgh, A. Henderson, L. Izatt, A. Kumar, F. Laloo, Z. Miedzybrodzka, P. J. Morrison, J. Paterson, M. Porteous, M. T. Rogers, S. Shanley, L. Walker, D. Eccles, D. G. Evans, A. Renwick, S. Seal, C. J. Lord, A. Ashworth, J. S. Reis-Filho, A. C. Antoniou and N. Rahman (2011). "Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer." Nat Genet **43**(9): 879-882.

Loveday, C., C. Turnbull, E. Ruark, R. M. Xicola, E. Ramsay, D. Hughes, M. Warren-Perry, K. Snape, C. Breast Cancer Susceptibility, D. Eccles, D. G. Evans, M. Gore, A. Renwick, S. Seal, A. C. Antoniou and N. Rahman

(2012). "Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer." Nat Genet **44**(5): 475-476; author reply 476.

Loveday, C., C. Turnbull, E. Ruark, R. M. Xicola, E. Ramsay, D. Hughes, M. Warren-Perry, K. Snape, D. Eccles, D. G. Evans, M. Gore, A. Renwick, S. Seal, A. C. Antoniou and N. Rahman (2012). "Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer." Nat Genet **44**(5): 475-476; author reply 476.

Lu, H. M., S. Li, M. H. Black, S. Lee, R. Hoiness, S. Wu, W. Mu, R. Huether, J. Chen, S. Sridhar, Y. Tian, R. McFarland, J. Dolinsky, B. Tippin Davis, S. Mexal, C. Dunlop and A. Elliott (2018). "Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing." JAMA Oncol.
Lynch, H. T. and A. de la Chapelle (2003). "Hereditary colorectal cancer." N Engl J Med **348**(10): 919-932.

Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky and et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-1238.

Manchanda, R., S. Patel, V. S. Gordeev, A. C. Antoniou, S. Smith, A. Lee, J. L. Hopper, R. J. MacInnis, C. Turnbull, S. J. Ramus, S. A. Gayther, P. D. P. Pharoah, U. Menon, I. Jacobs and R. Legood (2018). "Cost-effectiveness of Population-Based BRCA1, BRCA2, RAD51C, RAD51D, BRIP1, PALB2 Mutation Testing in Unselected General Population Women." J Natl Cancer Inst **110**(7): 714-725.

Marquis, S. T., J. V. Rajan, A. Wynshaw-Boris, J. Xu, G. Y. Yin, K. J. Abel, B. L. Weber and L. A. Chodosh (1995). "The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues." Nat Genet **11**(1): 17-26.

Masson, J. Y., A. Z. Stasiak, A. Stasiak, F. E. Benson and S. C. West (2001). "Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8440-8446.

Masson, J. Y., M. C. Tarsounas, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, R. Shah, M. J. McIlwraith, F. E. Benson and S. C. West (2001). "Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs." Genes Dev **15**(24): 3296-3307.

Mavaddat, N., D. Barrowdale, I. L. Andrulis, S. M. Domchek, D. Eccles, H. Nevanlinna, S. J. Ramus, A. Spurdle, M. Robson, M. Sherman, A. M. Mulligan, F. J. Couch, C. Engel, L. McGuffog, S. Healey, O. M. Sinilnikova, M. C. Southey, M. B. Terry, D. Goldgar, F. O'Malley, E. M. John, R. Janavicius, L. Tihomirova, T. V. Hansen, F. C. Nielsen, A. Osorio, A. Stavropoulou, J. Benitez, S. Manoukian, B. Peissel, M. Barile, S. Volorio, B. Pasini, R. Dolcetti, A. L. Putignano, L. Ottini, P. Radice, U. Hamann, M. U. Rashid, F. B. Hogervorst, M. Krieger, R. B. van der Luijt, S. Peock, D. Frost, D. G. Evans, C. Brewer, L. Walker, M. T. Rogers, L. E. Side, C. Houghton, J. Weaver, A. K. Godwin, R. K. Schmutzler, B. Wappenschmidt, A. Meindl, K. Kast, N. Arnold, D. Niederacher, C. Sutter, H. Deissler, D. Gadzicki, S. Preisler-Adams, R. Varon-Mateeva, I. Schonbuchner, H. Gevensleben, D. Stoppa-Lyonnet, M. Belotti, L. Barjhoux, C. Isaacs, B. N. Peshkin, T. Caldes, M. de la Hoya, C. Canadas, T. Heikkinen, P. Heikkila, K. Aittomaki, I. Blanco, C. Lazaro, J. Brunet, B. A. Agnarsson, A. Arason, R. B. Barkardottir, M. Dumont, J. Simard, M. Montagna, S. Agata, E. D'Andrea, M. Yan, S. Fox, T. R. Rebbeck, W. Rubinstein, N. Tung, J. E. Garber, X. Wang, Z. Fredericksen, V. S. Pankratz, N. M. Lindor, C. Szabo, K. Offit, R. Sakr, M. M. Gaudet, C. F. Singer, M. K. Tea, C. Rappaport, P. L. Mai, M. H. Greene, A. Sokolenko, E. Imyanitov, A. E. Toland, L. Senter, K. Sweet, M. Thomassen, A. M. Gerdes, T. Kruse, M. Caligo, P. Aretini, J. Rantala, A. von Wachenfeld, K. Henriksson, L. Steele, S. L. Neuhausen, R. Nussbaum, M. Beattie, K. Odunsi, L. Sucheston, S. A. Gayther, K. Nathanson, J. Gross, C. Walsh, B. Karlan, G. Chenevix-Trench, D. F. Easton and A. C. Antoniou (2012). "Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **21**(1): 134-147.

McBride, K. A., M. L. Ballinger, E. Killick, J. Kirk, M. H. Tattersall, R. A. Eeles, D. M. Thomas and G. Mitchell (2014). "Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management." Nat Rev Clin Oncol **11**(5): 260-271.

McGlynn, P. and R. G. Lloyd (2002). "Recombinational repair and restart of damaged replication forks." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(11): 859-870.

McKernan, K. J., H. E. Peckham, G. L. Costa, S. F. McLaughlin, Y. Fu, E. F. Tsung, C. R. Clouser, C. Duncan, J. K. Ichikawa, C. C. Lee, Z. Zhang, S. S. Ranade, E. T. Dimalanta, F. C. Hyland, T. D. Sokolsky, L. Zhang, A. Sheridan, H. Fu, C. L. Hendrickson, B. Li, L. Kotler, J. R. Stuart, J. A. Malek, J. M. Manning, A. A. Antipova, D. S. Perez, M. P. Moore, K. C. Hayashibara, M. R. Lyons, R. E. Beaudoin, B. E. Coleman, M. W. Laptewicz, A. E. Sannicandro, M. D. Rhodes, R. K. Gottimukkala, S. Yang, V. Bafna, A. Bashir, A. MacBride, C. Alkan, J. M. Kidd, E. E. Eichler, M. G. Reese, F. M. De La Vega and A. P. Blanchard (2009). "Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding." Genome Res **19**(9): 1527-1541.

Mehta, A. and J. E. Haber (2014). "Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(9): a016428.

Meindl, A., H. Hellebrand, C. Wiek, V. Erven, B. Wappenschmidt, D. Niederacher, M. Freund, P. Lichtner, L. Hartmann, H. Schaal, J. Ramser, E. Honisch, C. Kubisch, H. E. Wichmann, K. Kast, H. Deissler, C. Engel, B. Muller-Myhsok, K. Neveling, M. Kiechle, C. G. Mathew, D. Schindler, R. K. Schmutzler and H. Hanenberg (2010). "Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene." Nat Genet **42**(5): 410-414.

Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." Nat Rev Genet **11**(1): 31-46.

Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. M. Bennett and W. Ding (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.

Milne, R. L. (2009). "Variants in the ATM gene and breast cancer susceptibility." Genome medicine **1**(1): 12-12.

Morgan, R. D., G. J. Burghel, N. Flaum, M. Bulman, A. R. Clamp, J. Hasan, C. L. Mitchell, H. Schlecht, E. R. Woodward, F. I. Lallo, E. J. Crosbie, R. J. Edmondson, A. J. Wallace, G. C. Jayson and D. G. R. Evans (2019). "Prevalence of germline pathogenic BRCA1/2 variants in sequential epithelial ovarian cancer cases." J Med Genet **56**(5): 301-307.

Nagy, R., K. Sweet and C. Eng (2004). "Highly penetrant hereditary cancer syndromes." Oncogene **23**(38): 6445-6470.

Nalepa, G. and D. W. Clapp (2018). "Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship." Nat Rev Cancer **18**(3): 168-185.

Ngoi, N. Y. L., D. Tay, V. Heong, Y. L. Thian, P. Y. Ong, S. G. W. Ow, A. D. Jeyasekharan, Y. W. Lim, S. E. Lim, S. C. Lee, J. Ng, J. J. H. Low, A. Ilancheran, S. Z. L. Koh and D. S. P. Tan (2018). "Reversal of Bowel Obstruction With Platinum-Based Chemotherapy and Olaparib in Recurrent, Short Platinum-Free Interval, RAD51C Germline Mutation-Associated Ovarian Cancer." JCO Precision Oncology(2): 1-8.

Nielsen, F. C., T. van Overeem Hansen and C. S. Sorensen (2016). "Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways." Nat Rev Cancer **16**(9): 599-612.

Nieuwenhuis, M. H., C. M. Kets, M. Murphy-Ryan, H. G. Yntema, D. G. Evans, C. Colas, P. Møller, F. J. Hes, S. V. Hodgson, M. J. Olderode-Berends, S. Aretz, K. Heinimann, E. B. Gómez García, F. Douglas, A. Spigelman, S. Timshel, N. M. Lindor and H. F. Vasen (2014). "Cancer risk and genotype-phenotype correlations in PTEN hamartoma tumor syndrome." Fam Cancer **13**(1): 57-63.

Norquist, B. M., M. I. Harrell, M. F. Brady, T. Walsh, M. K. Lee, S. Gulsuner, S. S. Bernards, S. Casadei, Q. Yi, R. A. Burger, J. K. Chan, S. A. Davidson, R. S. Mannel, P. A. DiSilvestro, H. A. Lankes, N. C. Ramirez, M. C. King, E. M. Swisher and M. J. Birrer (2016). "Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma." JAMA Oncol **2**(4): 482-490.

Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.

Palmero, E. I., M. I. Achatz, P. Ashton-Prolla, M. Olivier and P. Hainaut (2010). "Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome." Curr Opin Oncol **22**(1): 64-69.

Paull, T. T. and J. H. Lee (2005). "The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM." Cell Cycle **4**(6): 737-740.

Pavel Dundr, K. N. "Epitelové nádory ovaria,děložní tuby a peritonea "DOPORUČENÝ POSTUP PRO BIOPTICKÉ VYŠETŘENÍ."

Peng, M., R. Litman, J. Xie, S. Sharma, R. M. Brosh, Jr. and S. B. Cantor (2007). "The FANCD1/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells." *Embo j* **26**(13): 3238-3249.

Pezzolesi, M. G., P. Platzer, K. A. Waite and C. Eng (2008). "Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome." *Am J Hum Genet* **82**(5): 1141-1149.

Pharoah, P. D. P., H. Song, E. Dicks, M. P. Intermaggio, P. Harrington, C. Baynes, K. Alsop, N. Bogdanova, M. S. Cicek, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, A. Gentry-Maharaj, P. Hillemanns, S. Lele, J. Lester, V. McGuire, K. B. Moysich, S. Poble, W. Sieh, L. Sucheston-Campbell, M. Widschwendter, A. S. Whittemore, T. Dörk, U. Menon, K. Odunsi, E. L. Goode, B. Y. Karlan, D. D. Bowtell, S. A. Gayther and S. J. Ramus (2016). "PPM1D Mosaic Truncating Variants in Ovarian Cancer Cases May Be Treatment-Related Somatic Mutations." *J Natl Cancer Inst* **108**(3).

Pittman, D. L., L. R. Weinberg and J. C. Schimenti (1998). "Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene." *Genomics* **49**(1): 103-111.

Plaskocinska, I., H. Shipman, J. Drummond, E. Thompson, V. Buchanan, B. Newcombe, C. Hodgkin, E. Barter, P. Ridley, R. Ng, S. Miller, A. Dann, V. Licence, H. Webb, L. T. Tan, M. Daly, S. Ayers, B. Rufford, H. Earl, C. Parkinson, T. Duncan, M. Jimenez-Linan, G. S. Sagoo, S. Abbs, N. Hulbert-Williams, P. Pharoah, R. Crawford, J. D. Brenton and M. Tischkowitz (2016). "New paradigms for BRCA1/BRCA2 testing in women with ovarian cancer: results of the Genetic Testing in Epithelial Ovarian Cancer (GTEOC) study." *J Med Genet* **53**(10): 655-661.

Prat, J. (2014). "Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum." *Int J Gynaecol Obstet* **124**(1): 1-5.

Rafnar, T., D. F. Gudbjartsson, P. Sulem, A. Jonasdottir, A. Sigurdsson, A. Jonasdottir, S. Besenbacher, P. Lundin, S. N. Stacey, J. Gudmundsson, O. T. Magnusson, L. le Roux, G. Orlygsdottir, H. T. Helgadóttir, H. Johannsdóttir, A. Gylfason, L. Tryggvadóttir, J. G. Jonasson, A. de Juan, E. Ortega, J. M. Ramon-Cajal, M. D. Garcia-Prats, C. Mayordomo, A. Panadero, F. Rivera, K. K. Aben, A. M. van Altena, L. F. Massuger, M. Aavikko, P. M. Kujala, S. Staff, L. A. Aaltonen, K. Olafsdóttir, J. Björnsson, A. Kong, A. Salvarsdóttir, H. Saemundsson, K. Olafsson, K. R. Benediksdóttir, J. Gulcher, G. Masson, L. A. Kiemeny, J. I. Mayordomo, U. Thorsteinsdóttir and K. Stefansson (2011). "Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer." *Nat Genet* **43**(11): 1104-1107.

Ramus, S. J., H. Song, E. Dicks, J. P. Tyrer, A. N. Rosenthal, M. P. Intermaggio, L. Fraser, A. Gentry-Maharaj, J. Hayward, S. Philpott, C. Anderson, C. K. Edlund, D. Conti, P. Harrington, D. Barrowdale, D. D. Bowtell, K. Alsop, G. Mitchell, M. S. Cicek, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, J. Alsop, M. Jimenez-Linan, S. Poble, S. Lele, L. Sucheston-Campbell, K. B. Moysich, W. Sieh, V. McGuire, J. Lester, N. Bogdanova, M. Durst, P. Hillemanns, K. Odunsi, A. S. Whittemore, B. Y. Karlan, T. Dörk, E. L. Goode, U. Menon, I. J. Jacobs, A. C. Antoniou, P. D. Pharoah and S. A. Gayther (2015). "Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer." *J Natl Cancer Inst* **107**(11).

Ramus, S. J., H. Song, E. Dicks, J. P. Tyrer, A. N. Rosenthal, M. P. Intermaggio, L. Fraser, A. Gentry-Maharaj, J. Hayward, S. Philpott, C. Anderson, C. K. Edlund, D. Conti, P. Harrington, D. Barrowdale, D. D. Bowtell, K. Alsop, G. Mitchell, A. S. Group, M. S. Cicek, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, J. Alsop, M. Jimenez-Linan, S. Poble, S. Lele, L. Sucheston-Campbell, K. B. Moysich, W. Sieh, V. McGuire, J. Lester, N. Bogdanova, M. Durst, P. Hillemanns, C. Ovarian Cancer Association, K. Odunsi, A. S. Whittemore, B. Y. Karlan, T. Dörk, E. L. Goode, U. Menon, I. J. Jacobs, A. C. Antoniou, P. D. Pharoah and S. A. Gayther (2015). "Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer." *J Natl Cancer Inst* **107**(11).

Ratajska, M., E. Antoszewska, A. Piskorz, I. Brozek, A. Borg, H. Kusmirek, W. Biernat and J. Limon (2012). "Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families." *Breast Cancer Res Treat* **131**(1): 89-97.

Reid, S., A. Renwick, S. Seal, L. Baskcomb, R. Barfoot, H. Jayatilake, K. Pritchard-Jones, M. R. Stratton, A. Ridolfi-Lüthy and N. Rahman (2005). "Biallelic BRCA2 mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour." *Journal of Medical Genetics* **42**(2): 147-151.

Rodriguez, A. and A. D'Andrea (2017). "Fanconi anemia pathway." *Curr Biol* **27**(18): R986-r988.

Ruark, E., K. Snape, P. Humburg, C. Loveday, I. Bajrami, R. Brough, D. N. Rodrigues, A. Renwick, S. Seal, E. Ramsay, V. Duarte Sdel, M. A. Rivas, M. Warren-Perry, A. Zachariou, A. Champion-Flora, S. Hanks, A. Murray, N. Ansari Pour, J. Douglas, L. Gregory, A. Rimmer, N. M. Walker, T. P. Yang, J. W. Adlard, J. Barwell, J. Berg, A. F. Brady, C. Brewer, G. Brice, C. Chapman, J. Cook, R. Davidson, A. Donaldson, F. Douglas, D. Eccles, D. G. Evans, L. Greenhalgh, A. Henderson, L. Izatt, A. Kumar, F. Laloo, Z. Miedzybrodzka, P. J. Morrison, J. Paterson, M. Porteous, M. T. Rogers, S. Shanley, L. Walker, M. Gore, R. Houlston, M. A. Brown, M. J. Caufield, P. Deloukas, M. I. McCarthy, J. A. Todd, C. Turnbull, J. S. Reis-Filho, A. Ashworth, A. C. Antoniou, C. J. Lord, P. Donnelly and N. Rahman (2013). "Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer." *Nature* **493**(7432): 406-410.

Rust, K., P. Spiliopoulou, C. Y. Tang, C. Bell, D. Stirling, T. Phang, R. Davidson, M. Mackean, F. Nussey, R. M. Glasspool, N. S. Reed, A. Sadozye, M. Porteous, T. McGoldrick, M. Ferguson, Z. Miedzybrodzka, I. A. McNeish and C. Gourley (2018). "Routine germline BRCA1 and BRCA2 testing in patients with ovarian carcinoma: analysis of the Scottish real-life experience." *BJOG* **125**(11): 1451-1458.

Sawyer, S. L., L. Tian, M. Kähkönen, J. Schwartzentruber, M. Kircher, J. Majewski, D. A. Dymant, A. M. Innes, K. M. Boycott, L. A. Moreau, J. S. Moilanen and R. A. Greenberg (2015). "Biallelic Mutations in *BRCA1* Cause a New Fanconi Anemia Subtype." *Cancer Discovery* **5**(2): 135-142.

Scartozzi, M., M. De Nictolis, E. Galizia, P. Carassai, F. Bianchi, R. Berardi, R. Gesuita, A. Piga, R. Cellerino and E. Porfiri (2003). "Loss of hMLH1 expression correlates with improved survival in stage III-IV ovarian cancer patients." *Eur J Cancer* **39**(8): 1144-1149.

Schutte, M., L. T. da Costa, S. A. Hahn, C. Moskaluk, A. T. Hoque, E. Rozenblum, C. L. Weinstein, M. Bittner, P. S. Meltzer, J. M. Trent and et al. (1995). "Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the BRCA2 region." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13): 5950-5954.

Schärer, O. D. (2013). "Nucleotide excision repair in eukaryotes." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(10): a012609.

Seal, S., D. Thompson, A. Renwick, A. Elliott, P. Kelly, R. Barfoot, T. Chagtai, H. Jayatilake, M. Ahmed, K. Spanova, B. North, L. McGuffog, D. G. Evans, D. Eccles, D. F. Easton, M. R. Stratton and N. Rahman (2006). "Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles." *Nat Genet* **38**(11): 1239-1241.

Seelinger, M. and M. Otterlei (2020). "Helicase-Like Transcription Factor HLTF and E3 Ubiquitin Ligase SHPRH Confer DNA Damage Tolerance through Direct Interactions with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)." *Int J Mol Sci* **21**(3).

Seemanová, E., P. Jarolim, P. Seeman, R. Varon, M. Digweed, M. Swift and K. Sperling (2007). "Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation." *J Natl Cancer Inst* **99**(24): 1875-1880.

Sehgal, R., K. Sheahan, P. R. O'Connell, A. M. Hanly, S. T. Martin and D. C. Winter (2014). "Lynch syndrome: an updated review." *Genes (Basel)* **5**(3): 497-507.

Sekiguchi, J. M. and D. O. Ferguson (2006). "DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey." *Cell* **124**(2): 260-262.

Shendure, J. and H. Ji (2008). "Next-generation DNA sequencing." *Nat Biotechnol* **26**(10): 1135-1145.

Shih Ie, M. and R. J. Kurman (2004). "Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis." *Am J Pathol* **164**(5): 1511-1518.

Shimamura, A. and B. P. Alter (2010). "Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes." *Blood Rev* **24**(3): 101-122.

Shivji, M. K., S. R. Mukund, E. Rajendra, S. Chen, J. M. Short, J. Savill, D. Klenerman and A. R. Venkitaraman (2009). "The BRC repeats of human BRCA2 differentially regulate RAD51 binding on single- versus double-stranded DNA to stimulate strand exchange." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13254-13259.

Silva, E. G., D. M. Gershenson, A. Malpica and M. Deavers (2006). "The recurrence and the overall survival rates of ovarian serous borderline neoplasms with noninvasive implants is time dependent." Am J Surg Pathol **30**(11): 1367-1371.

Silwal-Pandit, L., A. Langerød and A.-L. Børresen-Dale (2017). "TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **7**(1): a026252.

Slyskova, J., M. Sabatella, C. Ribeiro-Silva, C. Stok, A. F. Theil, W. Vermeulen and H. Lans (2018). "Base and nucleotide excision repair facilitate resolution of platinum drugs-induced transcription blockage." Nucleic Acids Res **46**(18): 9537-9549.

Sobin, L. H., Gospodarowicz, M K, Wittekind, Ch (2009). TNM classification of malignant tumours / edited by L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, and Ch. Wittekind., Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2010.

Song, H., M. S. Cicek, E. Dicks, P. Harrington, S. J. Ramus, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, J. P. Tyrer, J. Alsop, M. Jimenez-Linan, S. A. Gayther, E. L. Goode and P. D. Pharoah (2014). "The contribution of deleterious germline mutations in BRCA1, BRCA2 and the mismatch repair genes to ovarian cancer in the population." Hum Mol Genet **23**(17): 4703-4709.

Song, H., E. Dicks, S. J. Ramus, J. P. Tyrer, M. P. Intermaggio, J. Hayward, C. K. Edlund, D. Conti, P. Harrington, L. Fraser, S. Philpott, C. Anderson, A. Rosenthal, A. Gentry-Maharaj, D. D. Bowtell, K. Alsop, M. S. Cicek, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, J. Alsop, M. Jimenez-Linan, E. Høgdall, C. K. Høgdall, A. Jensen, S. K. Kjaer, J. Lubiński, T. Huzarski, A. Jakubowska, J. Gronwald, S. Poblete, S. Lele, L. Sucheston-Campbell, K. B. Moysich, K. Odunsi, E. L. Goode, U. Menon, I. J. Jacobs, S. A. Gayther and P. D. P. Pharoah (2015). "Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **33**(26): 2901-2907.

Soukupova, J., K. Lhotova, P. Zemankova, M. Vocka, M. Janatova, L. Stolarova, M. Borecka, P. Kleiblova, E. Machackova, L. Foretova, M. Koudova, F. Lhota, S. Tavandzis, M. Zikan, V. Stranecky, K. Vesela, A. Panczak, J. Kotlas and Z. Kleibl (2019). "Contribution of Massive Parallel Sequencing to Diagnosis of Hereditary Ovarian Cancer in the Czech Republic." Klin Onkol **32**(Supplementum2): 72-78.

Soukupova, J., P. Zemankova, K. Lhotova, M. Janatova, M. Borecka, L. Stolarova, F. Lhota, L. Foretova, E. Machackova, V. Stranecky, S. Tavandzis, P. Kleiblova, M. Vocka, H. Hartmannova, K. Hodanova, S. Kmocho and Z. Kleibl (2018). "Validation of CZECA-NCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes." PLoS One **13**(4): e0195761.

Steffen, J., G. Maneva, L. Poplawska, R. Varon, O. Mioduszezewska and K. Sperling (2006). "Increased risk of gastrointestinal lymphoma in carriers of the 657del5 NBS1 gene mutation." Int J Cancer **119**(12): 2970-2973.

Stradella, A., J. Del Valle, P. Rofes, L. Feliubadalo, E. Grau Garces, A. Velasco, S. Gonzalez, G. Vargas, A. Izquierdo, O. Campos, E. Tornero, M. Navarro, J. Balmana-Gelpi, G. Capella, M. Pineda, J. Brunet and C. Lazaro (2018). "Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression?" J Med Genet.

Stratton, M. R., P. J. Campbell and P. A. Futreal (2009). "The cancer genome." Nature **458**: 719.

Sung, P. and H. Klein (2006). "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions." Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**: 739.

Syed, A. and J. A. Tainer (2018). "The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair." Annu Rev Biochem **87**: 263-294.

- Syeda, A. H., M. Hawkins and P. McGlynn (2014). "Recombination and replication." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(11): a016550.
- Takata, M., M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson and S. Takeda (2001). "Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs." Mol Cell Biol **21**(8): 2858-2866.
- Tarsounas, M., P. Munoz, A. Claas, P. G. Smiraldi, D. L. Pittman, M. A. Blasco and S. C. West (2004). "Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein." Cell **117**(3): 337-347.
- Taylor, A. M., A. Groom and P. J. Byrd (2004). "Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1219-1225.
- Taylor, A. M. R., D. G. Harnden, C. F. Arlett, S. A. Harcourt, A. R. Lehmann, S. Stevens and B. A. Bridges (1975). "Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity." Nature **258**: 427.
- Thacker, J. (2005). "The RAD51 gene family, genetic instability and cancer." Cancer Lett **219**(2): 125-135.
- Tubbs, A. and A. Nussenzweig (2017). "Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer." Cell **168**(4): 644-656.
- Turnbull, C., A. Sud and R. S. Houlston (2018). "Cancer genetics, precision prevention and a call to action." Nat Genet **50**(9): 1212-1218.
- van Os, N. J., N. Roeleveld, C. M. Weemaes, M. C. Jongmans, G. O. Janssens, A. M. Taylor, N. Hoogerbrugge and M. A. Willemsen (2016). "Health risks for ataxia-telangiectasia mutated heterozygotes: a systematic review, meta-analysis and evidence-based guideline." Clin Genet **90**(2): 105-117.
- van Roy, F. and G. Berx (2008). "The cell-cell adhesion molecule E-cadherin." Cell Mol Life Sci **65**(23): 3756-3788.
- Varon, R., C. Vissinga, M. Platzer, K. M. Cerosaletti, K. H. Chrzanowska, K. Saar, G. Beckmann, E. Seemanova, P. R. Cooper, N. J. Nowak, M. Stumm, C. M. Weemaes, R. A. Gatti, R. K. Wilson, M. Digweed, A. Rosenthal, K. Sperling, P. Concannon and A. Reis (1998). "Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome." Cell **93**(3): 467-476.
- Vaz, F., H. Hanenberg, B. Schuster, K. Barker, C. Wiek, V. Erven, K. Neveling, D. Endt, I. Kesterton, F. Autore, F. Fraternali, M. Freund, L. Hartmann, D. Grimwade, R. G. Roberts, H. Schaal, S. Mohammed, N. Rahman, D. Schindler and C. G. Mathew (2010). "Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder." Nat Genet **42**(5): 406-409.
- Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson (2003). "Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12871-12876.
- Villa, M., C. Cassani, E. Gobbini, D. Bonetti and M. P. Longhese (2016). "Coupling end resection with the checkpoint response at DNA double-strand breaks." Cell Mol Life Sci **73**(19): 3655-3663.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2015). "The Path to Cancer — Three Strikes and You're Out." New England Journal of Medicine **373**(20): 1895-1898.
- Walsh, M. F., V. Y. Chang, W. K. Kohlmann, H. S. Scott, C. Cunniff, F. Bourdeaut, J. J. Molenaar, C. C. Porter, J. T. Sandlund, S. E. Plon, L. L. Wang and S. A. Savage (2017). "Recommendations for Childhood Cancer Screening and Surveillance in DNA Repair Disorders." Clin Cancer Res **23**(11): e23-e31.
- Walsh, T., S. Casadei, M. K. Lee, C. C. Pennil, A. S. Nord, A. M. Thornton, W. Roeb, K. J. Agnew, S. M. Stray, A. Wickramanayake, B. Norquist, K. P. Pennington, R. L. Garcia, M. C. King and E. M. Swisher (2011). "Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(44): 18032-18037.

Watson, P., R. Butzow, H. T. Lynch, J. P. Mecklin, H. J. Jarvinen, H. F. Vasen, L. Madlensky, P. Fidalgo, I. Bernstein and H. International Collaborative Group on (2001). "The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Gynecol Oncol **82**(2): 223-228.

Watson, P. and H. T. Lynch (2001). "Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers." Fam Cancer **1**(1): 57-60.

Weber-Lassalle, N., J. Borde, K. Weber-Lassalle, J. Horváth, D. Niederacher, N. Arnold, S. Kaulfuß, C. Ernst, V. G. Paul, E. Honisch, K. Klaschik, A. E. Volk, C. Kubisch, S. Rapp, N. Lichey, J. Altmüller, L. Lepkes, E. Pohl-Rescigno, H. Thiele, P. Nürnberg, M. Larsen, L. Richters, K. Rhiem, B. Wappenschmidt, C. Engel, A. Meindl, R. K. Schmutzler, E. Hahnen and J. Hauke (2019). "Germline loss-of-function variants in the BARD1 gene are associated with early-onset familial breast cancer but not ovarian cancer." Breast Cancer Res **21**(1): 55.

Wheeler, D. A., M. Srinivasan, M. Egholm, Y. Shen, L. Chen, A. McGuire, W. He, Y. J. Chen, V. Makhijani, G. T. Roth, X. Gomes, K. Tartaro, F. Niazi, C. L. Turcotte, G. P. Irzyk, J. R. Lupski, C. Chinault, X. Z. Song, Y. Liu, Y. Yuan, L. Nazareth, X. Qin, D. M. Muzny, M. Margulies, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs and J. M. Rothberg (2008). "The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing." Nature **452**(7189): 872-876.

Whitworth, J., A. B. Skytte, L. Sunde, D. H. Lim, M. J. Arends, L. Happerfield, I. M. Frayling, R. van Minkelen, E. R. Woodward, M. D. Tischkowitz and E. R. Maher (2016). "Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome: A Case Series and Review." JAMA Oncol **2**(3): 373-379.

Whitworth, J., P. S. Smith, J. E. Martin, H. West, A. Luchetti, F. Rodger, G. Clark, K. Carss, J. Stephens, K. Stirrups, C. Penkett, R. Mapeta, S. Ashford, K. Megy, H. Shakeel, M. Ahmed, J. Adlard, J. Barwell, C. Brewer, R. T. Casey, R. Armstrong, T. Cole, D. G. Evans, F. Fostira, L. Greenhalgh, H. Hanson, A. Henderson, J. Hoffman, L. Izatt, A. Kumar, A. Kwong, F. Laloo, K. R. Ong, J. Paterson, S. M. Park, R. Chen-Shtoyerman, C. Searle, L. Side, A. B. Skytte, K. Snape, E. R. Woodward, N. B. R. D. Consortium, M. D. Tischkowitz and E. R. Maher (2018). "Comprehensive Cancer-Predisposition Gene Testing in an Adult Multiple Primary Tumor Series Shows a Broad Range of Deleterious Variants and Atypical Tumor Phenotypes." Am J Hum Genet **103**(1): 3-18.

Wooster, R., G. Bignell, J. Lancaster, S. Swift, S. Seal, J. Mangion, N. Collins, S. Gregory, C. Gumbs and G. Micklem (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**(6559): 789-792.

Wu, L. C., Z. W. Wang, J. T. Tsan, M. A. Spillman, A. Phung, X. L. Xu, M. C. Yang, L. Y. Hwang, A. M. Bowcock and R. Baer (1996). "Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product." Nat Genet **14**(4): 430-440.

Xia, B., J. C. Dorsman, N. Ameziane, Y. de Vries, M. A. Rooimans, Q. Sheng, G. Pals, A. Errami, E. Gluckman, J. Llera, W. Wang, D. M. Livingston, H. Joenje and J. P. de Winter (2007). "Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2." Nat Genet **39**(2): 159-161.

Xia, B., Q. Sheng, K. Nakanishi, A. Ohashi, J. Wu, N. Christ, X. Liu, M. Jasin, F. J. Couch and D. M. Livingston (2006). "Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2." Mol Cell **22**(6): 719-729.

Xu, X., D. Jin, J. Durgan and A. Hall (2013). "LKB1 controls human bronchial epithelial morphogenesis through p114RhoGEF-dependent RhoA activation." Mol Cell Biol **33**(14): 2671-2682.

Yang, X., G. Leslie, A. Doroszuk, S. Schneider, J. Allen, B. Decker, A. M. Dunning, J. Redman, J. Scarth, I. Plaskocinska, C. Luccarini, M. Shah, K. Pooley, L. Dorling, A. Lee, M. A. Adank, J. Adlard, K. Aittomaki, I. L. Andrulis, P. Ang, J. Barwell, J. L. Bernstein, K. Bobolis, A. Borg, C. Blomqvist, K. B. M. Claes, P. Concannon, A. Cuggia, J. O. Culver, F. Damiola, A. de Pauw, O. Diez, J. S. Dolinsky, S. M. Domchek, C. Engel, D. G. Evans, F. Fostira, J. Garber, L. Golmard, E. L. Goode, S. B. Gruber, E. Hahnen, C. Hake, T. Heikkinen, J. E. Hurley, R. Janavicius, Z. Kleibl, P. Kleiblova, I. Konstantopoulou, A. Kvist, H. Laduca, A. S. G. Lee, F. Lesueur, E. R. Maher, A. Mannermaa, S. Manoukian, R. McFarland, W. McKinnon, A. Meindl, K. Metcalfe, N. A. Mohd Taib, J. Moilanen, K. L. Nathanson, S. Neuhausen, P. S. Ng, T. Nguyen-Dumont, S. M. Nielsen, F. Obermair, K. Offit, O. I. Olopade, L. Ottini, J. Penkert, K. Pylkas, P. Radice, S. J. Ramus, V. Rudaitis, L. Side, R. Silva-Smith, V. Silvestri, A. B. Skytte, T. Slavin, J. Soukupova, C. Tondini, A. H. Trainer, G. Unzeitig, L. Usha, T. van Overeem Hansen, J. Whitworth, M. Wood, C. H. Yip, S. Y. Yoon, A. Yussuf, G. Zogopoulos, D.

Goldgar, J. L. Hopper, G. Chenevix-Trench, P. Pharoah, S. H. L. George, J. Balmana, C. Houdayer, P. James, Z. El-Haffaf, H. Ehrencrona, M. Janatova, P. Peterlongo, H. Nevanlinna, R. Schmutzler, S. H. Teo, M. Robson, T. Pal, F. Couch, J. N. Weitzel, A. Elliott, M. Southey, R. Winqvist, D. F. Easton, W. D. Foulkes, A. C. Antoniou and M. Tischkowitz (2020). "Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families." J Clin Oncol **38**(7): 674-685.

Yang, X., G. Leslie, A. Doroszuk, S. Schneider, J. Allen, B. Decker, A. M. Dunning, J. Redman, J. Scarth, I. Plaskocinska, C. Luccarini, M. Shah, K. Pooley, L. Dorling, A. Lee, M. A. Adank, J. Adlard, K. Aittomäki, I. L. Andrulis, P. Ang, J. Barwell, J. L. Bernstein, K. Bobolis, Å. Borg, C. Blomqvist, K. B. M. Claes, P. Concannon, A. Cuggia, J. O. Culver, F. Damiola, A. de Pauw, O. Diez, J. S. Dolinsky, S. M. Domchek, C. Engel, D. G. Evans, F. Fostira, J. Garber, L. Golmard, E. L. Goode, S. B. Gruber, E. Hahnen, C. Hake, T. Heikkinen, J. E. Hurley, R. Janavicius, Z. Kleibl, P. Kleiblova, I. Konstantopoulou, A. Kvist, H. Laduca, A. S. G. Lee, F. Lesueur, E. R. Maher, A. Mannermaa, S. Manoukian, R. McFarland, W. McKinnon, A. Meindl, K. Metcalfe, N. A. Mohd Taib, J. Moilanen, K. L. Nathanson, S. Neuhausen, P. S. Ng, T. Nguyen-Dumont, S. M. Nielsen, F. Obermair, K. Offit, O. I. Olopade, L. Ottini, J. Penkert, K. Pylkäs, P. Radice, S. J. Ramus, V. Rudaitis, L. Side, R. Silva-Smith, V. Silvestri, A. B. Skytte, T. Slavin, J. Soukupova, C. Tondini, A. H. Trainer, G. Unzeitig, L. Usha, T. van Overeem Hansen, J. Whitworth, M. Wood, C. H. Yip, S. Y. Yoon, A. Yussuf, G. Zogopoulos, D. Goldgar, J. L. Hopper, G. Chenevix-Trench, P. Pharoah, S. H. L. George, J. Balmaña, C. Houdayer, P. James, Z. El-Haffaf, H. Ehrencrona, M. Janatova, P. Peterlongo, H. Nevanlinna, R. Schmutzler, S. H. Teo, M. Robson, T. Pal, F. Couch, J. N. Weitzel, A. Elliott, M. Southey, R. Winqvist, D. F. Easton, W. D. Foulkes, A. C. Antoniou and M. Tischkowitz (2020). "Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families." J Clin Oncol **38**(7): 674-685.

Yi, C. and C. He (2013). "DNA repair by reversal of DNA damage." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1): a012575.

Yuan Lu, Y. S., Wesley Warren, Ronald Walter (2016). Next Generation Sequencing in Aquatic Models, IntechOpen.

Zannini, L., D. Delia and G. Buscemi (2014). "CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond." J Mol Cell Biol **6**(6): 442-457.

Zhang, L., Y. Bao, M. Riaz, J. Tiller, D. Liew, X. Zhuang, D. J. Amor, A. Huq, L. Petelin, M. Nelson, P. A. James, I. Winship, J. J. McNeil and P. Lacaze (2019). "Population genomic screening of all young adults in a health-care system: a cost-effectiveness analysis." Genet Med.

Zheng, Y., J. Zhang, K. Hope, Q. Niu, D. Huo and O. I. Olopade (2010). "Screening RAD51C nucleotide alterations in patients with a family history of breast and ovarian cancer." Breast Cancer Res Treat **124**(3): 857-861.

Zikán, M. (2016). "[Gynecological Care and Prevention of Gynecological Malignancies in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers]." Klin Onkol **29 Suppl 1**: S22-30.

Masarykův onkologický ústav (2019) "guidelines pro karcinom vaječníků a vejcovodu."

PŘÍLOHY

Příloha 1 – Plný text manuskriptu: Lhotova, K., L. Stolarova, P. Zemankova, M. Vocka, M. Janatova, M. Borecka, M. Cerna, S. Jelinkova, J. Kral, Z. Volkova, M. Urbanova, P. Kleiblova, E. Machackova, L. Foretova, J. Hazova, P. Vasickova, F. Lhota, M. Koudova, L. Cerna, S. Tavandzis, J. Indrakova, L. Hruskova, M. Kosarova, R. Vrtel, V. Stranecky, S. Kmocho, M. Zikan, L. Macurek, Z. Kleibl, and J. Soukupova. 2020. "***Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer.***" *Cancers (Basel)* 12 (4). doi: 10.3390/cancers12040956.